

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
6. Oktober 2005 (06.10.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/093095 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12Q 1/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/003366

(22) Internationales Anmeldedatum:  
24. März 2005 (24.03.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
04090117.5 24. März 2004 (24.03.2004) EP  
04090431.0 12. November 2004 (12.11.2004) EP  
60/634,820 10. Dezember 2004 (10.12.2004) US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **EPIGENOMICS AG** [DE/DE]; Kleine Präsidenten-  
str. 1, 10178 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **DIETRICH, Dima**  
[DE/DE]; Katharinenstr. 27, 10711 Berlin (DE).  
**SCHATZ, Philipp** [DE/DE]; Winsstr. 41, 10405 Berlin  
(DE). **SCHUSTER, Matthias** [DE/DE]; Kastanienallee  
107, 13158 Berlin (DE). **KLUTH, Antje** [DE/DE]; Dith-  
marscher Strasse 41, 22049 Hamburg (DE).

(74) Anwalt: **SCHUBERT, Klemens**; Neue Promenade 5,  
10178 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,  
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,  
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,  
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR ANALYSIS OF CYTOSINE METHYLATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ANALYSE VON CYTOSINMETHYLIERUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for analysis of cytosine methylation in DNA. The DNA for analysis is firstly chemically or enzymatically converted. A promoter is then introduced into the DNA. The DNA is then transformed into RNA. The methylation pattern for the DNA can be determined in various ways by analysis of the RNA. The RNA is preferably chemically or enzymatically fragmented before the analysis, whereby the fragmentation occurs depending on the methylation pattern of the DNA. Said method is particularly suitable for the diagnosis and prognosis of cancerous diseases and other diseases associated with a change in the methylation pattern.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben ist ein Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen in DNA. Dabei wird die zu untersuchende DNA zunächst chemisch oder enzymatisch umgewandelt. Anschließend wird in die DNA ein Promotor eingeführt. Die DNA wird dann in RNA überführt. Über unterschiedliche Wege kann über eine Analyse der RNA auf das Methylierungsmuster der DNA geschlossen werden. Bevorzugt wird die RNA vor der Analyse chemisch oder enzymatisch fragmentiert, wobei die Fragmentierung in Abhängigkeit von dem Methylierungsmuster der DNA erfolgt. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere zur Diagnose und Prognose von Krebserkrankungen sowie anderer mit einer Veränderung des Methylierungsmusters assoziierten Krankheiten.



WO 2005/093095 A1

## Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Analyse von methylierten Cytosinpositionen in DNA.

### Hintergrund der Erfindung

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt eine wichtige biologische Rolle, u.a. bei der Transkriptionsregulation, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese (zur Übersicht: Millar et al.: Five not four: History and significance of the fifth base. In: The Epigenome, S. Beck and A. Olek (eds.), Wiley-VCH Verlag Weinheim 2003, S. 3-20). Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichen Interesse. Ein Nachweis der Methylierung ist allerdings schwierig, da Cytosin und 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweisen. Viele der herkömmlichen, auf Hybridisierung beruhenden Nachweisverfahren vermögen daher nicht zwischen Cytosin und Methylcytosin zu unterscheiden. Zudem geht die Methylierungsinformation bei einer PCR-Amplifikation vollständig verloren.

Die herkömmlichen Methoden zur Methylierungsanalyse arbeiten im wesentlichen nach zwei unterschiedlichen Prinzipien. Zum einen werden methylierungsspezifische Restriktionsenzyme benutzt, zum anderen erfolgt eine selektive chemische Umwandlung von nicht-methylierten Cytosinen in Uracil (sog.: Bisulfit-Behandlung, siehe etwa: DE

101 54 317 A1; DE 100 29 915 A1). Da die Behandlung mit methylierungsspezifischen Restriktionsenzymen durch die Sequenzspezifität der Enzyme auf bestimmte Sequenzen beschränkt ist, wird für die meisten Anwendungen eine Bisulfit-Behandlung durchgeführt (zur Übersicht DE 100 29 915 A1 S.2, Zeilen 35-46). Die chemisch vorbehandelte DNA wird dann meist amplifiziert und kann auf unterschiedliche Weise analysiert werden (zur Übersicht: WO 02/072880 S. 1 ff; Fraga and Esteller: DNA Methylation: A Profile of Methods and Applications. Biotechniques 33:632-649, Sept. 2002). Eine selektive Amplifikation nur der methylierten (bzw. bei umgekehrten Ansatz: unmethylierten) DNA kann über die Verwendung methylierungsspezifischer Primer oder Blocker erfolgen (sog. methylierungssensitive PCR/MSP bzw. Heavy Methyl-Verfahren, vgl.: Herman et al.: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 3;93(18):9821-6; Cottrell et al.: A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. Nucl. Acids. Res. 2004 32: e10). Die Detektion der Amplifikate geschieht über unterschiedliche Verfahren, etwa über Gelelektrophorese, Chromatographie, Massenspektrometrie, Hybridisierung an Oligomer-Arrays, Sequenzierung, Primer-Extension oder Real-Time-PCR-Varianten (vgl. Fraga and Esteller 2002, a.a.o.).

Aufgrund der besonderen biologischen und medizinischen Bedeutung der Cytosinmethylierung besteht ein besonderes technisches Bedürfnis an sensitiven, einfachen, schnellen und kostengünstigen Verfahren zur Methylierungsanalyse. Im folgenden ist ein solches Verfahren beschrieben. Dabei

erfolgt zunächst eine Bisulfitumwandlung der DNA. Danach wird die bisulfitierte DNA in RNA transkribiert, und die Transkripte werden anschließend weiter analysiert. Die Analyse der Transkripte hat im Vergleich zur Analyse der DNA mehrere technische Vorteile. So ist

5 die RNA etwa für eine massenspektrometrische Untersuchung besser geeignet als DNA (s.u.). Auch kann ein Nachweis über Hybridisierung aufgrund der Einzelsträngigkeit der RNA einfacher erfolgen (s.u.). Weiterhin kann die RNA -  
10 nicht aber die DNA - chemisch oder enzymatisch so fragmentiert werden, dass das Fragmentierungsmuster abhängig von dem ursprünglichen Methylierungsstatus der DNA ist (s.u.). Nicht zuletzt erlaubt die Umwandlung in RNA auch die Anwendung von auf Transkription basierenden Amplifi-  
15 kationsverfahren. Dies ist mit mehreren Vorteilen verbunden (s.u.).

Zwar sind einzelne der im folgenden beschriebenen besonderen Ausführungsformen bereits für die Analyse von Mutationen oder Polymorphismen bekannt. Die vorliegende Erfindung kombiniert allerdings zum ersten Mal eine Bisulfitierung mit einer Umwandlung der DNA in RNA und einer anschließenden Analyse der RNA. Der Methylierungsanalyse wird daher erstmals ein Zugang zu diesen bereits etablierten Technologien zur Nukleinsäureanalytik eröffnet. Aufgrund der besonderen Bedeutung der Cytosinmethylierung und aufgrund des großen technischen Bedürfnis an schlagkräftigen Verfahren zur Methylierungsanalyse stellt das Eröffnen dieser Technologie einen bedeutenden technischen  
30 Fortschritt dar.

Eine besondere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Methylierungsanalyse ist dadurch gekennzeichnet, dass die bisulfitierte DNA mittels eines auf Transkription basierenden Amplifikationsverfahrens (TAS-transcription based amplification system) in RNA umgewandelt wird. Hierzu gehören etwa NASBA™, 3SR™ oder TMA™. Die Einzelheiten dieser Verfahren sind dem Fachmann bekannt (zur Übersicht: Deiman et al., Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). Mol Biotechnol 2002 Feb;20(2):163-79 mit weiteren Nachweisen). Die Anwendung der TAS-Amplifikationsverfahren hat gegenüber den bekannten PCR-Verfahren hat mehrere Vorteile, die im Detail in den oben zitierten Veröffentlichungen beschrieben sind. Hierzu zählt insbesondere der isotherme Reaktionsverlauf.

In einer erfindungsgemäß besonders bevorzugten Ausführungsform des TAS-Verfahren erfolgt die Amplifikation in Gegenwart von sog. Blockeroligonukleotiden. Die Blocker binden an die sog. „Hintergrund-Nukleinsäuren“ und erschweren deren Amplifikation. So kann eine Spezifitätserhöhung der Methylierungsanalyse erreicht werden. Unter Hintergrund-Nukleinsäure wird diejenige RNA bzw. DNA verstanden, die dieselbe Basensequenz wie die DNA trägt, die nachgewiesen werden soll, allerdings über einen anderen Methylierungsstatus verfügt. Ein häufiges Problem in der Methylierungsanalyse, insbesondere bei diagnostischen Anwendungen, besteht darin, dass sich in dem Probenmaterial neben der nachzuweisenden (etwa: krankheitsspezifische) DNA auch eine große Menge an Hintergrund-DNA befindet. Wird auch diese Hintergrund-DNA detektiert, so kommt es

zu falsch-positiven Ergebnissen. Der erfindungsgemäße Einsatz von Blocker-Oligonukleotiden führt dagegen zu einer erhöhten Spezifität und einer verringerten Gefahr falsch-positiver Ergebnisse.

5

Die Verwendung von methylierungsspezifischen Blockeroligonukleotiden in der methylierungsspezifischen PCR ist bereits bekannt (sog. HeavyMethyl™-Verfahren, Cottrell et al 2004, a.a.o.). Die Verwendung von Blockern in einer isothermen Amplifikationsverfahren zur Methylierungsanalyse ist allerdings noch nicht beschrieben.

10

15

20

25

30

Eine weitere besondere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Methylierungsanalyse ist dadurch gekennzeichnet, dass die bisulfitierte DNA in RNA überführt wird, und die RNA anschließend chemisch oder enzymatisch so fragmentiert wird, dass das Fragmentierungsmuster abhängig von dem ursprünglichen Methylierungsstatus der DNA ist. Die Fragmente können dann u.a. chromatographisch oder massenspektrometrisch nachgewiesen werden (s.u.). Dieses Verfahren hat mehrere Vorteile gegenüber den bekannten Methoden zur Methylierungsanalyse. So ist es möglich, detaillierte Methylierungsmuster innerhalb einer CpG-Insel in einem Allel aufzuklären. Die gängigen Verfahren zur methylierungsspezifischen Detektion sind dagegen kaum in der Lage, die Methylierungszustände mehrerer Cytosinpositionen gleichzeitig zu erfassen. Lediglich Bisulfit-Sequenzierungsverfahren erlauben den Nachweis individueller Cytosinmethylierungen. Die Bisulfit-Sequenzierung hat jedoch den Nachteil, dass Positionen in unmittelbarer Nähe des Sequenzierprimers nur schwer nach-

gewiesen werden können. Das gleiche gilt für Positionen, die vom Sequenzierstart weit entfernt sind. Zudem ist das erfindungsgemäße Verfahren schneller, kostengünstiger und leichter automatisierbar als die Sequenzierung.

5

In einer weiteren besondere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Transkripte massenspektroskopisch analysiert. RNA ist für eine massenspektrometrische Analyse besser geeignet als DNA. So stabilisiert die 2'OH-Gruppe des Ribose-Rings die N-glykosidische Bindung zwischen Nukleinbase und Ribose. Die bei einer massenspektrometrischen Analyse typische Depurinierung wird so verhindert. Dadurch ist RNA für diese Art der Analyse besser als DNA geeignet (vgl.: Kirpekar et al.: Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of enzymatically synthesized RNA up to 150 kDa. Nucl. Acids. Res. 1994 22: 3866-3870; Nordhoff et al.: Ion stability of nucleic acids in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry; Nucl. Acids. Res. 1993 21: 3347-3357).

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens kombiniert eine methylierungsspezifische enzymatische Fragmentierung (s.o.) mit einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse. So wird die RNA bevorzugt mittels des Enzyms RNAase T1 fragmentiert und anschließend mittels MALDI analysiert. Ähnliche Verfahren zum Nachweis von Einzel-nukleotidpolymorphismen (SNP) oder kurzen Tandem Wiederholungen (STR) sind bereits beschrieben (Krebs et al.: RNAseCut: a MALDI mass spectrometry-based method for SNP

discovery. Nucleic Acids Res. 2003 Apr 1;31(7):e37.;  
Seichter et al.: Rapid and accurate characterisation of  
short tandem repeats by MALDI-TOF analysis of endonucle-  
ase cleaved RNA transcripts. Nucleic Acids Res. 2004 Jan  
5 20;32(2):E16.; Hartmer et al.: RNase T1 mediated base-  
specific cleavage and MALDI-TOF MS for high-throughput  
comparative sequence analysis. Nucleic Acids Res. 2003  
May 1;31(9):e47). Bei der SNP oder STR-Analyse erfolgt  
die Transkription und die Fragmentierung allerdings nur,  
10 um eine massenspektrometrische Analyse der DNA zu er-  
leichtern. Dabei ist die Anzahl der Enzymschnittstellen  
gleichbleibend und die entstandenen kurzen RNA Fragmente  
unterscheiden sich nur aufgrund der Basenzusammensetzung.  
Dadurch können die Massenunterschiede der Fragmente sehr  
15 klein sein (ca. 1-40 Da bei SNPs). Ein Rückschluß von dem  
Fragmentierungsmuster auf die zu untersuchenden Positio-  
nen ist nach den bereits beschriebenen Verfahren nicht  
möglich. Die Anwendung der bereits bekannten Methodik auf  
die Methylierungsanalyse führt daher zu unerwarteten Vor-  
20 teilen, da hier die Anzahl der Enzymschnittstellen direkt  
mit der Methylierung der zu untersuchenden DNA korre-  
liert.

### Beschreibung

25 Bei der Erfindung handelt es sich um ein Verfahren zur  
Analyse von Cytosinmethylierungen in DNA, bei dem folgen-  
de Schritte durchgeführt werden:

- 1) die zu untersuchende DNA wird so umgesetzt, dass 5-  
30 Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethy-  
liertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base



umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,

- 2) in die DNA wird eine Promotorsequenz eingeführt,
- 3) es wird RNA transkribiert,
- 5 4) die RNA wird analysiert,
- 5) es wird auf den Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen.

Im ersten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird  
10 die zu untersuchende DNA mit einer Chemikalie oder mit einem Enzym so umgesetzt, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet. Dabei  
15 kann die zu untersuchende DNA je nach diagnostischer oder wissenschaftlicher Fragestellung aus unterschiedlichen Quellen stammen. Für diagnostische Fragestellungen dienen als Ausgangsmaterial bevorzugt Gewebeproben, aber auch Körperflüssigkeiten, insbesondere Serum. Möglich ist  
20 auch, die DNA aus Sputum, Stuhl, Urin oder Gehirnrückenmarks-Flüssigkeit zu verwenden. Vorzugsweise wird die DNA zunächst aus der biologischen Probe isoliert. Die DNA-Extraktion erfolgt nach Standardmethoden, aus Blut etwa unter Verwendung des Qiagen UltraSens DNA Extrakti-  
25 ons-Kits. Die isolierte DNA kann dann z.B. durch Umsatz mit Restriktionsenzymen fragmentiert werden. Die Reaktionsbedingungen und die in Frage kommenden Enzyme sind dem Fachmann bekannt und ergeben sich etwa aus den von den Herstellern mitgelieferten Protokollen. Anschließend wird  
30 die DNA chemisch oder enzymatisch umgewandelt. Bevorzugt erfolgt eine chemische Umsetzung mittels Bisulfit. Die

Bisulfitumwandlung ist dem Fachmann in unterschiedlichen Variationen bekannt (siehe etwa: Frommer et al.: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Mar 1;89(5):1827-31; Olek, A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 Dec 15;24(24):5064-6.; DE 100 29 915; DE 100 29 915). Besonders bevorzugt erfolgt die Bisulfitumwandlung in Gegenwart von denaturierenden Lösemitteln, etwa Dioxan, und eines Radikalfängers (vgl.: DE 100 29 915). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die DNA nicht chemisch, sondern enzymatisch umgewandelt. Dies ist etwa durch Einsatz von Cytidin-Deaminasen denkbar, die unmethylierte Cytidine schneller umsetzen als methylierte Cytidine. Ein entsprechendes Enzym ist kürzlich identifiziert worden (Bransteitter et al.: Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):4102-7).

Im zweiten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird in die vorbehandelte DNA ein Promotor eingeführt, der eine Umwandlung der zu untersuchenden DNA in RNA ermöglicht. Dem Fachmann sind hierzu unterschiedliche Verfahren bekannt. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine PCR durchgeführt, bei der einer der Primer eine Promotorsequenz trägt. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird das NASBA-Verfahren oder ein anderes auf Transkription basierendes Amplifikationsverfahren benutzt, bei dem ausgehend von DNA RNA-

Amplifikate hergestellt werden können (siehe im einzelnen unten). Es ist aber auch denkbar, andere Amplifikationsverfahren, etwa das Rolling Circle-Verfahren, zu benutzen. Bevorzugt erfolgt die Amplifikation methylierungs-  
5 unspezifisch. Es ist jedoch auch möglich, einen größeren Sequenzbereich methylierungsspezifisch zu amplifizieren und bestimmte Cytosinpositionen innerhalb dieser Sequenz mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens zu analysieren. Die Kombination von methylierungsspezifischer Ampli-  
10 fikation und RNA Transkription ermöglicht es aus einer Mischung verschiedener DNAs zunächst die in der Primerbindungssequenz methylierte Subpopulation zu vermehren und diese genauer auf ihre Methylierung hin zu untersuchen. Dadurch können spezielle Methylierungsmuster genau-  
15 er untersucht werden, etwa bei der Untersuchung von Sequenzen die an ihrem 5'-Ende methyliert und am 3'-Ende unmethyliert vorliegen. Diese Sequenzen sind besonders interessant für die Ausbreitung der DNA-Methylierung.

20 Weiterhin ist es denkbar, die Promotorsequenzen unabhängig von einer Amplifikation an die DNA zu ligieren. Dies ist etwa möglich, wenn die Bisulfit-DNA in einen Vektor kloniert wird, der bereits einen Promotor trägt. Eine Li-  
25 gation ohne vorherige Amplifikation hat dann den Vorteil, dass die Menge an RNA, die später durch die Transkription erzeugt wird, in einer linearen Abhängigkeit zu der eingesetzten DNA steht. Die PCR-basierten Verfahren führen dagegen zu einer exponentiellen Amplifi-  
kation, was eine Quantifizierung erschweren könnte.

Als Promotoren werden bevorzugt T7-, T3- oder SP6-Sequenzen eingesetzt. Es können aber auch andere RNA-Polymerase-Promotoren verwendet werden. Die Promotorsequenzen sind dem Fachmann bekannt.

5

Im dritten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Transkription. Die hierzu erforderlichen RNA-Polymerasen richten sich nach den eingebauten Promotorsequenzen. Die Transkriptionsbedingungen sind von der eingesetzten Polymerase abhängig. Einzelheiten sind dem  
10 Fachmann bekannt.

Im vierten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Transkripte analysiert. Aus den Ergebnissen kann  
15 dann im fünften Schritt auf den ursprünglichen Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen werden. Die Analyse der Transkripte kann über eine Vielzahl von bekannten molekularbiologischen Verfahren geschehen, etwa über Hybridisierung oder Sequenzierung. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Detektion über eine  
20 Hybridisierung an einen Mikroarray. Ein Mikroarray-basierter Nachweis kann mit Transkripten einfacher sein als mit DNA, da die RNA bereits in einzelsträngiger Form vorliegt und daher vor der Hybridisierung nicht mehr denaturiert werden muß. Dabei sind dem Fachmann Maßnahmen  
25 bekannt, die einen Abbau der RNA verhindern. Für die Hybridisierung an einen Array wird die RNA zuvor mit einer Markierung, bevorzugt einer Fluoreszenzmarkierung, versehen. Dies kann etwa mit Hilfe eines Transkriptionskits erfolgen, bei dem AminoAllyl markierten Nucleotiden in die RNA eingebaut werden (Amino Allyl MessageAmp™  
30 Kit; Ambion, USA). Die AminoAllyl Nukleotide werden von den RNA-Polymerasen mit nahezu gleicher Effizienz wie natürliche Nukleotide verwendet. Nach der Transkription

wird an die modifizierten Nukleotide ein Farbstoff gekoppelt. Weitere Verfahren zur Markierung von RNA gehören zum Stand der Technik (vgl. etwa: Monnot et al.: Labeling during cleavage (LDC), a new labeling approach for RNA. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2001 Apr-Jul;20(4-7):1177-9. Proudniko and Mirzabekov: Chemical methods of DNA and RNA fluorescent labeling. Nucleic Acids Res. 1996 Nov 15;24(22):4535-42).

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Analyse der RNA über massenspektrometrische Verfahren, etwa über Elektrospray oder PSD-Massenspektrometrie (vgl.: Little et al.: Verification of 50- to 100-mer DNA and RNA sequences with high-resolution mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Mar 14;92(6):2318-22). Die Verwendung von RNA statt DNA hat hier den Vorteil, dass die RNA während der massenspektrometrischen Analyse stabiler ist und über bessere Flugeigenschaften verfügt als DNA. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt eine Analyse der RNA über ein RNA-Protection-Assay. Einzelheiten sind dem Fachmann bekannt. Es sind weitere Analysemethoden denkbar, die die Einzelsträngigkeit der RNA oder ihre besonderen chemischen oder physikalischen Eigenschaften ausnutzen und daher vorteilhafter sind als ein direkter Nachweis der DNA. Die Verwendung dieser Methoden ist ebenfalls Teil dieser Erfindung.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die RNA vor der Analyse chemisch oder enzymatisch fragmentiert. So kann insbesondere die massenspektrometrische Analyse erleichtert werden (vgl.: Krebs et al. 2003,

a.a.o.; Seichter et al. 2004, a.a.o.; Hartmer et al. 2003, a.a.o.).

5        **Besonders bevorzugte Ausführungsformen - Einsatz auf  
Transkription basierender Amplifikationsverfahren**

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgen die Einführung der Promotorsequenz und die Transkription parallel mittels einem  
10 auf Transkription basierenden Amplifikationsverfahrens. Dementsprechend läßt sich diese Ausführungsform wie folgt beschreiben:

Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen in DNA,  
15 dadurch gekennzeichnet, dass folgende Schritte durchgeführt werden:

- 1) die zu untersuchende DNA wird so umgesetzt, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere  
20 Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,
- 2) die umgewandelte DNA wird mittels eines auf Transkription basierenden Amplifikationsverfahrens amplifiziert,
- 25 3) die Amplifikate werden analysiert,
- 4) es wird auf den Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen.

Als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren  
30 können hierzu die oben genauer beschriebenen Proben dienen. Die Bisulfitumwandlung erfolgt ebenfalls wie oben

dargestellt. Im zweiten Schritt dieser Ausführungsform erfolgt eine Amplifikation der umgewandelten DNA mittels eines auf Transkription basierenden Amplifikationsverfahrens, insbesondere mittels NASBA™, 3SR™ oder TMA™. Diese  
5 Verfahren sind dem Fachmann im Detail bekannt (vgl. etwa Deiman et al 2002, a.a.o.). Eine Anwendung dieser Verfahren auf die Untersuchung von Cytosin-Methylierungen ist allerdings - soweit ersichtlich - noch nicht beschrieben.

10 Die auf Transkription basierenden Amplifikationsverfahren sind der retroviralen Replikation nachgeahmt. Die Amplifikation der Zielsequenz erfolgt in der Regel mittels zweier Primer und dreier Enzyme. Über einen der Primer wird in die Zielsequenz ein T7-Promotorsequenz einge-  
15 führt, über den dann mittels einer T7-Polymerase RNA generiert werden kann. Die RNA wird über eine Reverse Transkriptase wiederum in DNA umgewandelt, und zwischenzeitlich auftretenden RNA-DNA-Intermediate werden mittels einer RNase-H abgebaut. Die Amplifikation erfolgt isotherm, in der Regel bei 41°C. Die generierten Amplifikate  
20 können über eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden detektiert werden, etwa über Gelelektrophorese, diverse chromatographische Verfahren oder die Verwendung von markierten, insbesondere fluoreszenzmarkierten Sonden. Auch  
25 der Einsatz von Real-Time-Sonden (Molecular Beacon) ist inzwischen beschrieben (vgl.: Deiman et al 2002, a.a.o.). In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Nachweis über methylierungsspezifische Sonden, die spezifisch nur an Amplifikate mit einem bestimmten Methylierungsstatus bin-  
30 den.

Dem Fachmann ist bekannt, wie er die oben beschriebenen Verfahren durchzuführen hat. Insbesondere sind ihm die Reaktionsbedingungen, die Reaktionskomponenten, das Design der Primer und die Analyseverfahren bekannt (zur Übersicht siehe: Deiman et al 2002, a.a.o).

Erfindungsgemäß werden die auf Transkription basierenden Amplifikationsverfahren angewendet, um spezifisch die DNA eines bestimmten Methylierungsstatus nachzuweisen. Dies ist zum einen über eine methylierungsspezifische Amplifikation mittels methylierungsspezifischer Primer oder methylierungsspezifischer Blockeroligonukleotide möglich (zu den Blockern siehe im einzelnen unten). Daneben ist es auch denkbar, die DNA methylierungsunspezifisch zu amplifizieren, aber die Amplifikate mittels methylierungsspezifischer Sonden nachzuweisen. Es ist auch möglich, methylierungsspezifische Amplifikation und methylierungsspezifische Detektion zu kombinieren.

Das Prinzip der Verwendung und des Designs methylierungsspezifischer Primer ist dem Fachmann insbesondere aus dem sogenannten „MSP-Verfahren“ (methylierungsspezifische PCR) bekannt (vgl.: Herman et al 1996, a.a.o.). Methylierungsspezifische Primer binden bevorzugt nur an diejenige DNA, die den Methylierungsstatus aufweist, der nachgewiesen werden soll. Dementsprechend tragen die methylierungsspezifische Primer mindestens ein CpG-Dinukleotid (für den Nachweis methylierter DNA) bzw. ein methylierungsspezifisches TG oder CA-Dinukleotid (für den Nachweis nicht-methylierter DNA auf den beiden möglichen DNA-Strängen). Die Prinzipien zum Design der methylier-



5      rungsspezifischen Primer sind dem Fachmann bekannt: Je höher die Anzahl der methylierungsspezifischen Dinukleotide und je kürzer die Länge der Primer, desto höher ist die Spezifität der Amplifikation. Auf der anderen Seite ist der Anwendungsbereich der Verfahren aufgrund der Sequenzanforderungen umso stärker eingeschränkt, je mehr methylierungsspezifische Dinukleotide in den Primern enthalten sein sollen. In der Regel werden bei MSP Primer 1 bis 4 methylierungsspezifischen Dinukleotiden verwendet.

10      Die aus der MSP bekannten Kriterien zum Primerdesign gelten im Prinzip auch für das erfindungsgemäße Verfahren. Hier ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Amplifikation isotherm bei nur 41°C erfolgt. Daher müssen die Primer im Vergleich zu MSP mehr methylierungsspezifische Dinukleotide enthalten, um eine vergleichbare Spezifität zu erreichen.

20      Im Prinzip ist es erfindungsgemäß ausreichend, wenn nur einer der beiden Primer methylierungsspezifisch konstruiert ist. Es ist jedoch bevorzugt, wenn beide Primer methylierungsspezifisch sind.

25      **Besonders bevorzugte Ausführungsformen - Einsatz auf Transkription basierender Amplifikationsverfahren in Kombination mit methylierungsspezifischen Blockermolekülen.**

30      Wie oben bereits beschrieben besteht insbesondere für diagnostische Anwendungen ein großes technisches Bedürfnis an Verfahren, die in der Lage sind, spezifisch Methy-

lierungsmuster nachzuweisen, wenn in der Probe neben der nachzuweisenden DNA ein starker Hintergrund von DNA derselben Sequenz, aber eines unterschiedlichen Methylierungsmusters vorliegt. Hier besteht insbesondere die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse. Eine Möglichkeit, um die Spezifität der Amplifikation zu erhöhen, ist die Verwendung von methylierungsspezifischen Blockermolekülen. Diese Blocker binden spezifisch an die Hintergrund-DNA und verhindern so deren Amplifikation. Ein solcher Einsatz von Blockern in einer methylierungsspezifischen PCR ist bereits mehrmals beschrieben (sog. HeavyMethyl™-Verfahren, PCT/EP02/02572). Die Verwendung von methylierungsspezifischen Blockern hat mehrere Vorteile im Vergleich zur Verwendung methylierungsspezifischer Primer (siehe: Cottrell et al 2004).

Die folgende besondere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kombiniert zum ersten Mal die Amplifikation bisulfitierter DNA mittels eines auf Transkription basierenden Amplifikationsverfahrens mit dem Einsatz methylierungsspezifischer Blocker. Diese Ausführungsform läßt sich wie folgt beschreiben:

Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen in DNA, dadurch gekennzeichnet, dass folgende Schritte durchgeführt werden:

- 1) die zu untersuchende DNA wird so umgesetzt, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base umgewandelt, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,

2) die umgewandelte DNA wird mittels eines auf Transkription basierenden Amplifikationsverfahrens amplifiziert, wobei die Amplifikation in Gegenwart mindestens eines methylierungsspezifischen Blockermoleküls stattfindet, das spezifisch an die Hintergrund-Nukleinsäure bindet, und deren Amplifikation behindert,

3) die Amplifikate werden analysiert,

4) es wird auf den Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen.

Unter „Hintergrund-Nukleinsäure“ ist dabei eine Nukleinsäure zu verstehen, die auf eine DNA zurückzuführen ist, die über dieselbe Sequenz, aber einen anderen Methylierungsstatus als die nachzuweisende DNA verfügt. Da die auf Transkription basierende Amplifikation überwiegend über RNA-Intermediate erfolgt, können methylierungsspezifische Blocker an die Hintergrund-RNA binden, und deren Amplifikation verhindern. Gleichwohl erfolgt der Amplifikationszyklus auch über eine Primerverlängerung. Dieser Schritt würde für die Hintergrund-DNA blockiert, wenn die Blocker an die Hintergrund-DNA bindet. Im optimalen Fall blockiert der Blocker die Amplifizierung sowohl über die RNA wie auch über die DNA.

Im Prinzip ist für die oben beschriebene Ausführungsform die aus dem „Heavy-Methyl“-Verfahren bekannte Blockertechnologie anwendbar. Diese ist im Detail in der WO-Anmeldung PCT/EP02/02572 beschrieben, auf die hier ausdrücklich verwiesen wird. Bei den Blockern handelt es sich bevorzugt um Oligonukleotide, es können aber auch

andere Moleküle, insbesondere PNA verwendet werden. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren können auch RNA-Blocker eingesetzt werden, da RNA-RNA-Hybride besonders stabil sind. Die Blocker sind methylierungsspezifisch, d.h. sie tragen mindestens ein CpG- bzw. ein methylierungsspezifisches TG- oder CA-Dinukleotid (s.o. zu den Primern). Die Primer werden bevorzugt im Überschuss zum Reaktionsansatz gegeben. In besonderen Ausführungsformen werden zwei oder mehr Blocker verwendet, die vorzugsweise mit den Bindungsstellen der Primer überlappen, um so zusätzlich eine Amplifikation zu verhindern. Ausserdem können die Blocker chemisch so modifiziert sein, dass eine Verlängerung oder ein Abbau der Blocker durch die Polymerase im Zuge der Amplifikation nicht erfolgt (siehe im einzelnen: PCT/EP02/02572; Cottrell et al. 2004, a.a.o). Dem Fachmann ist bekannt, dass alle bekannten und insbesondere in den oben zitierten Veröffentlichungen beschriebenen Ausführungsformen der Blockertechnologie weitgehend auch auf die erfindungsgemäße Kombination aus auf Transkription basierenden Amplifikationsverfahren und Blockereinsatz anwenden lassen. Die entsprechenden Ausführungsformen sind daher auch Teil dieser Erfindung.

Zwar der Einsatz von Blockern in der methylierungsspezifischen PCR schon bekannt, das erfindungsgemäße Verfahren bietet jedoch einen entscheidenden Vorteil gegenüber den bereits beschriebenen Verfahren. Die Blockeroligonukleotide binden an die Hintergrund-RNA und bilden so RNA-DNA-Hybride. Der RNA-Teil dieser Hybride kann im Reaktionszyklus durch das RNase H-Enzym abgebaut und somit der gesamten Amplifikationsreaktion entgültig entzogen werden.

Der Einsatz von Blockern führt hier also nicht - wie bei dem bekannten Heavy-Methyl™-Verfahren - nur zu einer Blockierung der Amplifikation der Hintergrund-Nukleinsäure, sondern darüberhinaus zu einem Abbau der Hintergrund-Nukleinsäure. Hieraus resultiert zu eine erhöhten Spezifität der Reaktion.

In dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die Amplifikation sowohl mittels methylierungsspezifischer Primer (s.o.) wie auch mittels methylierungsunspezifischer Primer erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform werden methylierungsunspezifische Primer eingesetzt.

Die Amplifikation erfolgt in Gegenwart mindestens eines methylierungsspezifischen Blockeroligomers. Diese tragen dementsprechend mindestens eine CpG-Position bzw. eine methylierungsspezifische TG oder CA- Position. Bevorzugt tragen die Oligomere 3-5 methylierungsspezifische Positionen. Bevorzugt werden Oligonukleotide verwendet, da die entsprechenden Hybride aus Blocker und RNA besonders effektiv von der RNase-H erkannt werden können. Die Blockeroligonukleotide sind bevorzugt zwischen 10 bis 25 Nukleotide lang. Die Blocker werden im Reaktionsansatz im Überschuß zu den Primern hinzugegen, besonders bevorzugt in einer 3 bis 15-fach höheren Konzentration.

Die Blocker können chemisch am 3' und/oder 5'-Ende modifiziert sein, um eine Verlängerung bzw. einen Abbau der Blocker zu verhindern. Einzelheiten sind dem Fachmann bekannt (PCT/EP02/02572).

Die Amplifikation findet dann unter den oben beschriebenen Bedingungen statt. Bevorzugt wird eine NASBA-Reaktion durchgeführt. Dementsprechend trägt einer der Primer einen T7-Promotor, der als Transkriptionsstartpunkt für die RNA-Polymerase dient. Der Primer hybridisiert an den (+) Strang der Zielsequenz. Hierzu erfolgt in der Regel ein kurzer Erhitzungsschritt. Der Primer wird durch die Reverse Transkriptase unter Bildung eines DNA-

Doppelstranges verlängert. Nach einem weiteren Erhitzungsschritt kann der zweite Primer an die soeben generierten (-) DNA-Strang binden. Durch eine weitere Primerextension wird dann ein DNA-Doppelstrang gebildet, der einen vollständigen T7-Promotor trägt. Die Bindung der methylierungsspezifischen Blocker an die Hintergrund-DNA blockiert hier eine Verlängerung der Hintergrund-DNA. Aus dem T7-Promotor heraus werden anschließend Transkripte generiert, die über RNA-DNA-Hybride wiederum in DNA-Doppelstränge umgewandelt werden. Dabei binden die methylierungsspezifischen Blockeroligonukleotide wiederum an die Hintergrund-RNA und verhindern so deren Amplifikation. Der RNA-Teil der gebildeten Blocker-RNA-Hybride wird dabei von der RNase H abgebaut. Die Hintergrund-RNA steht daher für weitere Amplifikationsrunden als Templat nicht mehr zur Verfügung. Die Amplifikation der nachzuweisenden DNA/RNA wird dagegen von den Blockern nicht beeinträchtigt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Detektion der Amplifikate mit Hilfe von Real-Time-Sonden. Eine Real-Time-Detektion von NASBA-Amplifikaten mit Hilfe von Molecular beacons ist bereits beschrieben (Deiman et al 2002, a.a.o.). Es sind aber auch die Verwendung anderer Real-

Time-Sonden denkbar, insbesondere der Einsatz von Light-cycler™-Sonden. Bevorzugt sind diese Sonden methylierungsspezifisch, d.h. sie tragen zumindest ein methylierungsspezifisches Dinukleotid (s.o.). Einzelheiten zum Aufbau entsprechender Sonden sind dem Fachmann bekannt (vgl.: PCT/EP02/02572; US 6,331,393)

Die besonders bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung methylierungsspezifischer Blockeroligonukleotide ist in Tabelle 1 dargestellt. Dort findet sich auch ein Vergleich zu dem bereits bekannten NASBA-Verfahren.

#### **Besonders bevorzugte Ausführungsformen - Analyse über Fragmentierung der RNA**

In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die RNA vor der Analyse chemisch oder enzymatisch fragmentiert. So kann insbesondere die massenspektrometrische Analyse erleichtert werden (vgl.: Krebs et al. 2003, a.a.o.; Seichter et al. 2004, a.a.o.; Hartmer et al. 2003, a.a.o.).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die RNA vor der Analyse in Abhängigkeit von dem Methylierungsstatus der DNA fragmentiert. Aus dem Fragmentierungsmuster kann dann auf das Methylierungsmuster geschlossen werden. Grundlage für die Möglichkeit einer methylierungsabhängigen Fragmentierung ist die Bisulfit-Umwandlung (bzw. eine analoge chemische oder enzymatische Umwandlung) in Kombination mit einer Amplifikation. Hierdurch ist es möglich, Nukleinsäuren zu

generieren, die Cytosine oder Guanine exakt nur an den Stellen tragen, an denen sich in der ursprünglichen DNA ein Methylcytosin befand. Die Nukleinsäuren werden dann spezifisch an den C- bzw. G-Positionen geschnitten. Es  
5 ergeben sich dann für den ursprünglichen Methylierungszustand spezifische Fragmentierungsmuster, die über unterschiedliche Methoden analysiert werden können.

Bei der Bisulfitumwandlung werden zunächst alle Cytosine  
10 in Uracil überführt, während methylierte Cytosine unverändert bleiben. Es entstehen so zwei DNA-Stränge, die nicht mehr zueinander komplementär sind. Nach einer Amplifikation allerdings gibt es wieder zwei komplementäre DNA-Stränge. Einer der Stränge enthält nur an den  
15 Stellen Cytosine, an denen sich in ursprünglichen DNA Methylcytosine befanden. Dieser Strang wird im folgenden als G-reich bezeichnet, da er an Cytosinen vergleichsweise arm ist. Wurde in diesen G-reichen Strang eine Promotorsequenz eingeführt, so kann ein komplementäres - nun  
20 C-reiches - RNA Molekül transkribiert werden. In diesem C-reichen Molekül sind nur an den Stellen Guanine vertreten, an denen sich in der ursprünglichen DNA Methylcytosine befanden. Die Guanine bilden in diesem RNA Transkript also exakt den Methylierungsstatus der Ur-  
25 sprungs-DNA ab. Entsprechend kann ein RNA-Molekül generiert werden, bei dem alle Cytosine ein Methylcytosin widerspiegeln. Die Guanin- oder Cytosinpositionen können dann spezifisch geschnitten werden. Hierzu sind sowohl enzymatische wie auch chemische Verfahren denkbar. Zur  
30 spezifischen enzymatischen Spaltung an G-Positionen wird besonders bevorzugt das Enzym RNase T1 eingesetzt (vgl.:



Hartmer et al. 2003, a.a.o.; Krebs et al. 2003, a.a.o.). Das Enzym ist von verschiedenen Herstellern kommerziell verfügbar (z.B. Roche Diagnostics Mannheim, Deutschland). Eine spezifische Spaltung von RNA an C-Positionen ist etwa mittels der RNase-A möglich, sofern in der Transkription chemisch modifizierte Uracil-Ribonukleotide eingesetzt werden (vgl.: Krebs et al. 2003, a.a.o.). Eine spezifische chemische Spaltung an C- oder G-Positionen ist mit Hilfe unterschiedlicher Reagenzien möglich (vgl.: Peattie: Direct chemical method for sequencing RNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Apr;76(4):1760-49); Krebs et al. 2003, a.a.o.).

Durch die Spaltungen ergeben sich spezifische Fragmentierungsmuster, die der örtlichen Verteilung der Methylcytosine auf der ursprünglich zu untersuchenden DNA entsprechen. Jedes entstehende Fragment stellt dabei den Bereich zwischen zwei methylierten Cytosinen in der Ursprungs-DNA dar. Die Anzahl der entstehenden Fragmente korreliert direkt mit der Anzahl der methylierten Cytosine. Die Eigenschaft, dass nur die ursprünglich methylierten Positionen Angriffspunkt für eine Fragmentierung sind, stellt einen entscheidendes Merkmal dieser besonders bevorzugten Ausführungsform dar. Denn bei den bekannten Verfahren zur Mutations/ Polymorphismen-Analyse ist die Anzahl der Fragmentierungsstellen unabhängig von der Sequenz der Ausgangsprobe. Es entstehen nach einer Fragmentierung folglich immer die gleiche Anzahl an Fragmenten, die sich nicht in der Anzahl der Nukleotide, sondern nur in der Basenzusammensetzung unterscheiden. Dies führt in der Regel zu eher kleinen chemisch-physikalischen Unterschieden

der Fragmente, die während der Analyse unter Umständen nicht mehr aufgelöst werden können. Zusätzlich ist diese Fragmentierung an sequenzunspezifischen Stellen dadurch gekennzeichnet, dass tendenziell sehr viele Fragmente  
5 entstehen (statistisch wird jedes vierte Nukleotid geschnitten), die damit sehr klein und schwer analysierbar sind. Insbesondere bei einer chromatographischen Analyse sind diese kleinen Fragmente nicht unterscheidbar.

Die hier beschriebene Methode überwindet diese Nachteile.

10 Darüber hinaus beinhaltet sie einen weiteren entscheidenden Vorteil. Da die Fragmentierung nur an ursprünglich methylierten Stellen erfolgt, stellt jedes entstehende Fragment die Sequenz zwischen den benachbarten methylierten Cytosinen dar. Befinden sich dazwischen beispielsweise unmethylierte CpG Stellen, so kann für ein einziges  
15 Ausgangs-DNA-Molekül eine gekoppelte Aussage über die Methylierung dieser CpGs getroffen werden. Desweiteren beeinflusst eine Fragmentierung an einer ursprünglich methylierten Stelle auch das benachbarte Fragment, da offensichtlich zwei benachbarte Fragmente Aufschluss über  
20 dieselbe CpG Stelle geben. Damit kann auch dieses benachbarte Fragment und der damit widerspiegelte Methylierungszustand einem einzigen Ausgangs-DNA-Molekül zugeordnet werden. Auf diese Weise kann z.B. die genetische Prägung, die allelspezifisch erfolgt, oder die Aktivität von Methyltransferasen genauer untersucht werden. Diese eindeutige Zuordnung des Methylierungsstatus zu einem einzigen Ausgangsmolekül kann mit methylierungsunspezifischen  
25 Fragmentierungen nicht getroffen werden. Dies ist gerade bei DNA-Mischungen von Interesse, die in der Regel ein komplexes Gemisch an verschiedenen methylierten DNA Molekü-

30

len enthält, von denen meistens nur Subpopulationen von Interesse sind.

Im Vergleich zu anderen fragmentierungsbasierten Methoden tritt bei der hier beschriebenen Methode eine eher wenig  
5 komplexe Fragmentierung auf, da nur an ursprünglich methylierten CpG Stellen geschnitten wird. Dies ermöglicht im Umkehrschluss die Analyse von eher komplexen Analyten. Damit können zum Beispiel mehrere unterschiedliche Loci im Genom simultan in der gleichen Reaktion untersucht werden.  
10 Diese Methode ist daher multiplexierbar, was ein entscheidender Vorteil ist, wenn nur eine limitierte Menge an Ausgangsprobenmaterial zur Verfügung steht. Andere Fragmentierungsmethoden erzeugen eine große Menge kleiner Fragmente, diese können in einer Multiplexreaktion nicht  
15 mehr den einzelnen Loci zugeordnet werden.

Über eine geeignete Analyse der entstandenen Fragmente kann der Methylierungsstatus aller in dem DNA-Amplifikat enthaltenen Cytosine festgestellt werden (vgl. Abb 1).  
20 Hierfür stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. In einer bevorzugten Ausführungsform werden massenspektrometrische Verfahren, insbesondere MALDI-TOF, eingesetzt. Über die genaue Masse der Fragmente und die Kenntnis der Sequenz der Ursprungs-DNA kann so exakt bestimmt werden, welche zwei Cytosine - nämlich die das  
25 Fragment eingrenzenden - methyliert waren. Einzelheiten zur MALDI-TOF Analyse sind dem Fachmann bekannt. Insbesondere sind in der US-Patentanmeldung US20030129589 eine Vielzahl von Möglichkeiten zur massenspektrometrischen  
30 Analyse angegeben, die in vielen Fällen entsprechend für

das erfindungsgemäße Verfahren anwendbar sind. In anderen bevorzugten Ausführungsformen erfolgt die Analyse des Fragmentierungsmusters der RNA über elektrophoretische oder chromatographische Methoden (z. B. Kapillargelelektrophorese oder HPLC). Diese Verfahren ermöglichen eine Quantifizierung der entstandenen RNA Fragmente durch Integration der Signalintensitäten (dem Fachmann ist dies bekannt). Liegt die zu untersuchende DNA als ein Gemisch von verschiedenen methylierten Spezies vor, so kann über diese Quantifizierung ein Rückschluß auf das vorliegende Mischungsverhältnis dieser Spezi getroffen werden.

Andere fragmentierungsbasierte Verfahren sind für solche elektrophoretischen und chromatographischen Analysemethoden nur beding geeignet, da sich bei der methylierungsspezifischen Fragmentierung nur die Basenzusammensetzung und nicht die Basenanzahl in einem Fragment unterscheidet. Dies kann z.B. mit Kapillargelelektrophorese nicht aufgelöst werden. Dies stellt einen weiteren Vorteil der beschriebenen Methode dar.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden neben dem Promotor zusätzlich Kontrollsequenzen in die DNA eingeführt, an Hand deren die Vollständigkeit der Fragmentierung überprüft werden kann. Trägt etwa der G-reiche Primer die Kontrollsequenz „TCTTTTC“, so resultiert eine RNA mit der zusätzlichen Sequenz "GAAAAGA". Alle anderen Guanine in dieser RNA stammen aus methylierten Cytosinen in der ursprünglichen DNA. Über einen Nachweis der Kontrollsequenzfragmente läßt sich die Vollständigkeit der Fragmentierungsreaktion kontrollieren (vgl.: Beispiele; Abbildung 2).

### **Verwendung der erfindungsgemäßen Verfahren**

Besonders bevorzugt werden die oben beschriebenen Verfahren zur Diagnose oder Prognose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten verwendet. Hierzu gehören u.a. CNS-Fehlfunktionen, Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich außerdem zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen und zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

### **Erfindungsgemäße Kits**

Erfindungsgemäß sind auch folgende Kits:

Ein Kit, der aus einer Bisulfitreagenz und aus mindestens einem Primern, der einen Promotor trägt, besteht.

Ein solcher Kit, der zusätzlich Enzyme und/oder weitere Komponenten zur Durchführung eines auf Transkription basierenden Amplifikationsbverfahren enthält.

5

Ein solcher Kit, der zusätzlich mindestens ein methylierungsspezifisches Blockeroligomer enthält.

10

Ein Kit, der aus einer Bisulfitreagenz, Primern und einem Enzym, das RNA nukleotidspezifisch schneidet, besteht und optional eine Polymerase und weiteren für eine Amplifikation erforderlichen Reagenzien enthält.

### Beispiele

15

Beispiel 1: Untersuchung des Promotorbereichs des humanen Adenomatosis Polyposis Coli (APC) Gens

20

Der Methylierungsstatus des Promotorbereichs des humanen Adenomatosis Polyposis Coli (APC) Gens (NM\_000038.2) sollte untersucht werden. Verwendet wurde hierbei eine DNA, die durch ein Enzym, welches alle Cytosine im CpG-Kontext methyliert, künstlich methyliert wurde (SssI Methyltransferase). Nach einer Bisulfitbehandlung der DNA wurde ein Bereich des Promotors mittels einer PCR amplifiziert. Für die PCR wurden folgende Bedingungen gewählt: 1U (0,2 µl) HotStarTaq Polymerase (Qiagen), 0,2 µl dNTP-Mix (je 25 mmol/l dATP, dGTP, dCTP und dTTP, Fermentas), 2,5 µl 10-fach PCR-Puffer (Qiagen), 2 µl Primermix (je 6,25 µmol/l, MWG Biotech AG), 1 µl partiell desaminierte DNA (10 ng), 19,1 µl Wasser, Temperaturprogramm: 10 min

30

95° und anschließend 40 Zyklen mit 30 s 95°C, 45 s 55°C und 1:30 min 72°C. Für diese Amplifikation wurden folgende beiden Primer verwandt: TCTT~~T~~TCGGTTAGGGTTAGGTAGGTTGT (G-reich) (Seq ID1) und GTAATAC~~G~~ACTCACTATAGGGAGACTACAC-  
5 CAATACAACCACATATC (C-reich) (Seq ID 2). Der unterstrichene Teil des C-reichen Primers stellt dabei den Promotor für die T7-Polymerase dar. In dem G-reichen Primer ist noch eine zusätzliche Sequenz enthalten (unterstrichen),  
10 die nach der Transkription des PCR-Produktes in ein RNA-Molekül am 3'-Ende dieses Produktes revers komplementär lokalisiert ist und damit nach der Abspaltung durch die RNase T1 ein Signal ergibt, welches die Vollständigkeit der Transkription anzeigt. Diese Sequenz stellt damit ein Kontrollfragment nach der Endonukleasebehandlung dar,  
15 welches unabhängig vom Methylierungsstatus immer entsteht. Für die Transkription des PCR-Produktes wurden folgende Bedingungen gewählt: 10 µl PCR-Produkt, 5 µl 5-fach T7 RNA-Polymerase Puffer (Fermentas), 1 µl T7 Polymerase (20 U/µl, Fermentas), 0,5 µl NTP-Mix (Fermentas,  
20 je 25 mmol/l), 8,5 µl Wasser. Die Inkubation erfolgte 1,5 h bei 37°C. Anschließend erfolgte der RNase Verdau durch Zugabe von 2,5 µl RNase T1 (10 U/µl, Fermentas) bei einer 45-minütigen Inkubation bei 37 °C. Dieser Reaktionsansatz wurde dann mit ca. 20 mg „clean resins“ der Firma Seque-  
25 nom inkubiert, um die Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ionenkonzentration der Lösung zu verringern. Schließlich wurden 0,5 µl des Mixes mit 0,5 µl 3-Hydroxypikolinsäure vermischt und mit einem Bruker Reflex 2 MALDI-TOF Massenspektrometer im negative Ionen Modus untersucht. Dabei wurde der Reflektor-  
30 Modus verwendet.

Die Transkription des PCR-Produktes ergibt ein Produkt folgender Sequenz (Seq ID 3): GGGAGACUA CACCAAUACAACCACAU-  
 AUCGAUCACGUACGCCCACACCCAACCAAUCGACGAACU <CCCGACGAAAAUAAAA-  
 AACGCCCUA AUCCGCAUCCAACGAAUUA CACAACUACUU <CUCUCUCCGCUUCCC-  
 5 GACCCGCACUCCGCAAUAAAACACAAAACCCCGCCCAAC <CGCACAACCUACCU-  
 AACCCUAACCGAAAAGA. Die "GGGAG" Sequenz zu Beginn dieses Moleküls stellt hierbei den verwendeten Promotor der T7 Polymerase dar, welcher teilweise mit transkribiert wurde. Die Sequenz "GAAAAGA" am Ende des RNA-Moleküls resul-  
 10 tiert aus der dem G-reichen Primer zusätzlich angehängten Kontrollsequenz. Alle anderen Guanine in diesem Molekül resultierten aus methylierten Cytosinen in der ursprünglichen DNA. Wäre diese DNA an diesen Stellen nicht methyliert gewesen, wären Adenine anstelle der Guanine zu fin-  
 15 den. Die RNase T1 spaltet nun die RNA hinter dem Guanin und führt zu einem Fragmentierungsmuster, welches den Methylierungsstatus der ursprünglichen DNA widerspiegelt. Die entstehenden Fragmente sind mit ihren entsprechenden m/z-Werten in Tabelle 2 aufgeführt.

20

Fragment-Nr.	Sequenz	m/z
1	Gp	345
2	Gp	345
3	Gp	345
4	AGp	674



Fragment-Nr.	Sequenz	m/z
5	ACUACACCAUACAACCACAUAUCGp	7938
6	AUCACGp	1920
7	UACGp	1286
8	CCCACACCCAACCAAUCGp	5678
9	ACGp	980
10	AACUCCCGp	2531
11	ACGp	980
12	AAAAUAAAAACGp	4249
13	CCCUAAUCCGp	3142
14	CAUCCAACGp	2860
15	AAUUACACAACUACUUCUCUCUCCGp	7846
16	CUUCCCGp	2178
17	ACCCGp	1590
18	CACUCCGp	2201
19	CAAUAAAACACAAAACCCCGp	6409

Fragment-Nr.	Sequenz	m/z
20	CCCAACCGp	2530
21	CACAACCUACCUAACCCUAACCGp	7254
22	AAAAGp	1662
23	A	267

Tabelle 2: Fragmente und ihre m/z-Werte der RNA nach einem Verdau des APC-198 Transkripts mit RNase T1.

In Abbildung 3 sind die mittels Maldi-TOF Massenspektrometrie detektierten Fragmente gezeigt, die aus dem RNase T1 Verdau des Transkriptes resultierten. Dort ist zu erkennen, dass fast alle Fragmente nachgewiesen werden konnten, die nach Tabelle 2 charakteristisch für die vollständig methylierte DNA sind. Lediglich Fragmente kleiner als m/z 980 konnten nicht detektiert werden, da in diesem Bereich die für die Maldi-TOF Analyse verwendete Matrix ein zu großes Hintergrundsignal erzeugt. Mittels dieses Spektrums konnte nun eindeutig bewiesen werden, dass die ursprüngliche DNA an allen Cytosinen im CpG Kontext methyliert war.

#### Beispiel 2: Untersuchung des Methylierungszustands des CDH13 Gens

Der Methylierungszustand des CDH13-Gens sollte untersucht werden. Dazu wurden Sss1-methylierte DNA, unmethylierte

Phi-DNA und ein geklontes methyliertes PCR-Amplifikat untersucht. Zur Kontrolle wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Das erfindungsgemäße Verfahren wurde wie oben beschrieben angewendet. Als Primer wurden folgende Sequenzen benutzt: TCTTTTCTTTGTATTAGGTTGGAAGTGGT (Seq ID4);

GTAATACGACTCACTATAGGGAGCCCAAATAAATCAACAACAACA (Seq ID5).

Die Transkription der Amplifikate ergab folgende Produkte: Methylierte DNA: GGGAGCCCAAUAAUACAACAACAUCACGAA-  
AACAUUAAUAAAAACUAAUAACCAAACCAAUAACUUUACAAAACGAAUCCUUC-  
CUAACGCUCCCUCGUUUUACAUAACAAUACGAAAUAAACACCUCGCGAAAAAC-  
GAACCCCGCGAAAAUAACAUCCCAUUUACUUCUUUAAACUAUUAACCUCAACCU-  
CACAAAUCACGCUAAACAAUACCAACUAAUUCCACUUUUCAAAAAUAAAAUUA-  
CACGAAAAACUAACGACCACUCCAACCUAUACAAAGAAAAAGA (Seq ID 6);

Methylierter Klon: GGGAGCCCAAUAAUACAACAACAUCACAAAAA-  
CAUUAUUAAAAACUAAUAACCAAACCAAUAACUUUACAAAACGAAUCCUCCU-  
AACGCUCCCUCGUUUUACAUAACAAUACGAAAUAAACACCUCGCGAAAAAC-  
GAACCCCGCGAAAAUAACAUCCCAUUUACUUCUUUAAACUAUUAACCUCAACCU-  
CACAAAUCACGCUAAACAAUACCAACUAAUUCCACUUUUCAGAAAAUAAAAUUA-  
CACGAAAAACUGACGACCACUCCAACCUAUACAAAGAAAAAGA (Seq ID7).

Die entstehenden Fragmente sind mit ihren entsprechenden m/z-Werten in Tabelle 3 aufgeführt.

Abbildung 4 zeigt die mittels Maldi-TOF Massenspektrometrie detektierten Fragmente, die aus dem RNase T1 Verdau des Transkriptes resultierten. Dabei konnten bei der künstlich aufmethylierten DNA alle Fragmente nachgewiesen werden, die charakteristisch für komplett methylierte DNA (Tabelle 3, Spalte 1 und 2) sind, lediglich Fragmente kleiner 980 (m/z) und größer 15250 (m/z) konnten gerätebedingt nicht nachgewiesen werden. In Tabelle 3 (Spalte 3 und 4) ist zusätzlich die Fragmentierung der klonierten DNA gezeigt. Hierbei sind die im folgenden beschriebenen

Unterschiede zu der künstlich aufmethylierten DNA sichtbar. Das 8619,3 (m/z) Fragment ist nicht mehr detektierbar. Dies liegt darin begründet, dass das Cytosin, welches im methylierten Zustand der zu untersuchenden DNA zu der Bildung des 8619,3 (m/z) und des 15723,7 (m/z) Fragmentes führen würde, offensichtlich nicht methyliert war. Dadurch entsteht ein 24021,8 (m/z) Fragment, welches dem Zusammenschluss dieser beiden Fragmente entspricht. Dieses Fragment konnte aber aufgrund seiner Größe gerätebedingt nicht detektiert werden. Bei der klonierten DNA sind mit dem 10103,1 (m/z) und dem 5166,2 (m/z) Fragment noch zwei Fragmente detektierbar, die zunächst nicht erwartet wurden. Ihre Entstehung resultiert aus einer - während der Bisulfitbehandlung der DNA - nicht stattgefundenen Umwandlung eines Cytosines ausserhalb des CpG Kontextes. Dadurch hatte das erwartet 15253,3 (m/z) Fragment eine zusätzliche Schnittstelle, welche eben diese beiden Fragmente bedingt. Die gleiche Ursache hat auch das Vorhandensein des 2602,6 (m/z) Fragmentes bei der klonierten DNA anstelle des zu erwartenden 3566,2 (m/z) Fragmentes. Auch hier war wieder ein Cytosin ausserhalb des CpG Kontextes nicht bei der Bisulfitbehandlung desaminiert worden und resultierte in einer Spaltung des 3566,2 (m/z) Fragmentes in ein 2602,6 (m/z) und ein 979,6 (m/z) (nicht detektierbar) Fragment. In Abbildung 4 ist zusätzlich noch das Spektrum der unmethylierten DNA gezeigt. Wie zu erwarten, treten hier neben dem 1991,3 (m/z) Fragment keine weiteren detektierbaren Fragmente auf, da das RNA Transkript der unmethylierten, bisulfitierten DNA keine weiteren Schnittstellen aufweist als die der bereits beschriebenen Kontrollsequenz am Ende des

Transkriptes. All diese Interpretationen konnten durch eine Sequenzierung bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

5

	Sequenz des RNA-Fragments		
m/z	Methylierte DNA	Klon	m/z
8619.3	CCCAAUAAAUCAA- CAACAACAUACGp	CCCAAUAAAUCAACAA- CAACAUCACAAAAACAUU- AAUAAAAACUAAUAAC- CAAAACAAUAACUUUACA- AAACGp	24021.8
15723.7	AAAACAUUAAAUAA- AAACUAAUAACCAA- AACCAUAACUUUA- CAAAACGp		
4718.8	AAUCCUUCU- AACGp	AAUCCUUCCUAACGp	4718.8
2483.5	CUCCCUCGp	CUCCCUCGp	2483.5
5731.4	UUUUACAUACAA- AUACGp	UUUUACAUACAAAUACGp	5731.4
4482.7	AAAUAAACACCUCGp	AAAUAAACACCUCGp	4482.7
650.4	CGp	CGp	650.4

	Sequenz des RNA-Fragments		
2296.4	AAAAACGp	AAAAACGp	2296.4
2224.3	AACCCCGp	AACCCCGp	2224.3
650.4	CGp	CGp	650.4
17722.7	AAAAUAACAUC- CAUUUACUUCUUUA- AACUAUUAAAACU- CAACCUCACAAAU- CACGp	AAAAUAACAUCCCAUUUA- CUUCUUUAAACUAUUAA- AACUCAACCUCACAAAU- CACGp	17722.7
15253.3	CUAAACAAUACCAA- CUAAUUCCACUU- UUCCAAAAAUAAA- AUUACACGp	CUAAACAAUACCAACUA- AUUCCACUUUCCAGp	10103.1 —
		AAAAUAAAAUUACACGp	5166.2
3566.2	AAAAACUAACGp	AAAAACUGp	2602.6
		ACGp	979.6
7303.4	ACCACUCCAACCU- AAUACAAAGp	ACCACUCCAACCUAUAC AAAGp	7303.4
1991.3	AAAAAGp	AAAAAGp	1991.3

Tabelle 3: Fragmente und ihre m/z-Werte der RNA nach einem Verdau des CDH13 Transkripts mit RNase T1.

#### 5 Beispiel 3 Analyse von klinischen Proben

Um die Anwendbarkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Analyse klinischer Fragestellungen zu zeigen, wurden zusätzlich mehrere Colon-Proben untersucht. Hierzu wurden jeweils zwei Tumor DNA-Proben mit einem hohen Methylierungsgrad analysiert.

rungsgrad und zwei normale Colon-Proben mit einem geringen Methylierungsgrad ausgewählt. Jeweils 10 Klone der amplifizierten Promotorregion des CDH13 Gens wurden wie unter Beispiel 2 beschrieben analysiert und mit Sequenzierungsdaten verglichen (Abb 5). Es zeigt sich eine sehr gute Korrelation zwischen beiden Methoden sowohl für die überwiegend methylierten (T1, T2) wie auch für die überwiegend unmethylierten Proben (N1, N2). Teilweise war die Sequenzierung nicht in der Lage, den Methylierungsstatus in den Positionen 32, 258 and 269 zu detektieren. Diese Positionen befinden sich entweder nahe am Sequenzierungsprimer oder am Ende der Sequenz. Auf der anderen Seite erlaubte der begrenzte Messbereich des verwendeten MALDI-Spektrometers keine eindeutige Zuordnung aller CpG-Positionen. So kann die Abwesenheit eines Fragments nicht zwangsläufig als Abwesenheit der Methylierung an der untersuchten Position interpretiert werden, es sei denn diese Aussage ist durch den Nachweis eines längeren Fragments gerechtfertigt.

In den Klonen A und J der Probe T1 wird die Anwesenheit des Fragments 6+7 ( $m/z=5117$ ) durch eine Methylierung an den Positionen 122 und 138, die die unmethylierte Position 136 einrahmen, verursacht. In dem Fall, dass mehrere benachbarte CpG-Positionen unmethyliert sind, werden die resultierenden Fragmente größer und damit schwerer zu detektieren. So erscheinen die Positionen 154 und 210 nicht analysierbar, da die entsprechenden Fragmente entweder so groß sind, dass sie sich nicht mehr verlässlich detektieren lassen, oder so klein sind, dass sie sich nicht mehr vom Hintergrundrauschen abheben. Dies stellt jedoch keine

grundsätzliche Einschränkung der Anwendbarkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens dar. Denn inzwischen sind Maldi-Geräte bekannt, die RNA bis zu einer Länge von 2180 Nukleotiden analysieren können, und die in der Lage sind, RNA- oder DNA-Fragmente in der Länge von 50 bis 100 Nukleotiden zu sequenzieren (Berkenkamp et al., Infrared MALDI mass spectrometry of large nucleic acids. *Science*, **281**, 260-262, 1998; Little et al. Verification of 50- to 100-mer DNA and RNA sequences with high-resolution mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2318-2322, 1995) .

#### Beispiel 4 Direkte Analyse klinischer Proben

Schließlich wurde ein Aliquot der bisulfitierten Colon-DNA-Proben direkt (ohne vorherige Klonierung) untersucht. Dazu wurde zunächst ein Standard aus unterschiedlichen Mischungen methylierter und unmethylierter DNA (0, 20, 40, 50, 60, 80, 100% methyliert) hergestellt und analysiert (Abb 6). Wie erwartet führt eine verringerte Methylierungsrate zu einer verringerten Intensität der detektierten Fragmente. Die gilt allerdings nicht für das Kontrollfragment ( $m/z = 1991$ ), das unabhängig von dem Methylierungsgrad gebildet wird und daher für die Signalnormalisierung verwendet werden kann. Im Vergleich zu dem Standard zeigen die klinischen Proben eine andere Intensitätsrate. Dies ist drauf zurückzuführen, dass einige benachbarte CpG-Positionen eine stärkere Comethylierung aufweisen als andere. Dies ergab sich bereits aus der Analyse der Klone (s.o.). So zeigt das starke Signal für die Fragmente 6, 8, 9, 13 und 14 in der Tumor Probe T1 einen relativ hohen Grad an Comethylierung bei den Posi-



tionen 122, 136, 138, 145, 152, 154, 258 und 269. Hierbei handelt es sich um exakt die Positionen, die in den meisten analysierten Fällen eine Comethylierung aufweisen (Abb 5). Die normalisierten relativen Intensitäten zeigen ein Minimum von 50% Methylierung in diesen Positionen. Dagegen ist die Abwesenheit eines Signals bzw. die Anwesenheit eines nur schwachen Signals für die Fragmente 1, 3, 4 und 5 darauf zurückzuführen, dass an den Positionen 32, 81, 96 und 104 nur ein geringer Grad an Comethylierung vorliegt. Diese Beobachtungen entsprechen den Klon-Daten aus Beispiel 2. Ein ähnliches Methylierungsmuster wurde für die Tumor-Probe T2 gefunden. Die geringere Intensität korrespondiert sehr gut mit der nur geringen Anzahl an Klonen, die in dieser Probe eine Comethylierung zeigen. Die normalen Colon Proben N1 und N2 zeigen weder bei der direkten Analyse noch bei der Klonanalyse eine Comethylierung. Insgesamt korrelieren die Ergebnisse der direkten Analyse der klinischen Proben sehr gut mit denen der Klonanalyse.

Die Comethylierung von Promotorregionen ist für viele klinische Fragestellungen von entscheidender Bedeutung. Wie in Abbildung 6 gezeigt, kann das erfindungsgemäße Verfahren die Anwesenheit von Comethylierungen in zwei oder mehr benachbarten Positionen nachweisen. Diese Selektivität stellt einen großen Vorteil gegenüber der direkten Bisulfit-Sequenzierung dar. Diese ist nicht in der Lage, zwischen spezifischen Methylierungsmustern und zufälliger Methylierung ohne klinische Bedeutung zu differenzieren (vgl.: Song et al.: Hypermethylation trigger of

the glutathione-S-transferase gene (GSTP1) in prostate cancer cells. *Oncogene*, **21**, 1048-1061, 2002).

5      Beispiel 5: Kombination aus allelspezifischer Amplifikation und T1 RNase-Charakterisierung

Es sollten Sequenzen aus dem Homo sapiens v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 Gen (PubMed Referenznummer: NM\_004448) untersucht werden. Dazu  
10      wurde DNA durch eine „molecular displacement amplification“ hergestellt. Da in der Amplifikation nur Cytosin, nicht aber Methylcytosin eingebaut wird, ist diese DNA arm an 5-Methylcytosin. Ein Teil dieser DNA wurde anschließend mittels der SssI-Methylase behandelt. So entsteht eine vollständig methylierte DNA. Anschließend wurde  
15      die DNA bisulfitiert und mit einer Polymerase Kettenreaktion sequenzspezifisch vervielfältigt. Dabei kamen Primer zum Einsatz, die in ihrer Sequenz Nukleotide enthielten, die nur in einem Bisulfit-Strang aus ursprünglich methylierter DNA vorkommen. Diese Primer amplifizierten daher nur bisulfitierte methylierte DNA. Folgende  
20      Primer wurden eingesetzt: TCTTTTTCATATACGTGTGGGTATAAAATC (Seq ID 8); GTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAaaTCAaCAaCAACGA (Seq ID 9). Diese Primer wurden in einer Endkonzentration von je 0.25 µmol/l mit 1xfach QiagenHotStar Puffer, 0,2 mmol/l dNTP (jedes dNTP), 0,04 U/µl HotStarTaq von Qiagen in 25 µl mit je 10 ng DNA Templat vermischt und PCR prozessiert. Dazu wurde folgendes PCR Programm verwendet:  
25      95°C, 15 min; 95°C, 1 min; 55°C, 45 s; 72°C, 1:30 min; 72°C, 10 min; 41 Wiederholungen. Diese PCR Produkte wur-

30

den auf einem Agarose Gel analysiert (siehe Abbildung 7). Nach der PCR Reaktion wurden 10  $\mu$ l des PCR Mixes mit 15  $\mu$ l Transkriptions-Mix vermengt. Dieser Mix war so gear-  
 5 tet, dass folgende Endkonzentrationen in einer 25  $\mu$ l Re-  
 aktion verwendet wurden: 1x MBI Fermentas T7-Puffer, 0.8  
 U/ $\mu$ l T7-RNA-Polymerase, 0,5 mmol/l NTPs (jedes). Diese  
 Mischung wurde 1 h bei 37° inkubiert und dann wurde 1  $\mu$ l  
 T1 RNase [50U/ $\mu$ l] hinzu gegeben. Nach der Zugabe wurde  
 10 erneut 1h bei 37° inkubiert. Anschließend wurde der Rak-  
 tionsansatz wie oben beschrieben massenspektrometrisch  
 untersucht. Ein so erzeugtes Spektrum ist in Abbildung 8  
 dargestellt. Tabelle 4 zeigt die bei vollständiger Methy-  
 lierung erwarteten und die bei der Messung detektierten  
 Massen. Es wurden alle für den Fall der vollständigen Me-  
 15 thylierung theoretisch vorhergesagten Massen, die größer  
 als 1000 Da waren, detektiert. Die untersuchte Sequenz  
 war komplett methyliert. Dies war nach der Behandlung mit  
 SssI Methylase zu erwarten. Die Masse 1991,2 Da AAAAAGp,  
 welche aus dem 5'-Schwanz des G-reichen Primers resul-  
 20 tierte zeigte die vollständige Transkription des PCR-  
 Produktes.

Markierung	Masse	Sequenz
n.d.	345.209	Gp
n.d	345.209	Gp
n.d	345.209	Gp
n.d.	674.418	AGp
7	6127.806	CAAAAUCAAACAACGp

4	5071.058	ACUUACUCCAAAACGp
n.d.	979.602	ACGp
8	12362.446	UCAAAACUUCUCUAAACACAUAUACUAAAAUAACAUUUCGp
5	5354.188	UAUCUAAACCUUCUACGp
2	3495.119	CAUACACUACGp
n.d.	650.393	CGp
6	5425.277	ACUACAUAAAAUJUACGp
3	5048.019	AUUUUUAUACCCACACGp
n.d.	1922.134	UAUAUGp
1	1991.254	AAAAAGp
n.d.	267.244	A

Tabelle 4: Fragmente und ihre m/z-Werte der RNA aus Beispiel 3 nach einem Verdau mit RNase T1.

#### Kurze Beschreibung der Abbildungen

5

Abbildung 1 zeigt schematisch das Prinzip einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. In die chemisch umgewandelte DNA wird ein Promotor eingeführt, aus dem heraus eine C-reiche RNA transkribiert wird. Durch einen T1-RNase-Verdau entsteht ein methylierungsspezifisches Fragmentierungsmuster.

10

Abbildung 2 zeigt schematisch das Prinzip der in Abbildung 1 beschriebenen erfindungsgemäßen Ausführungsform unter zusätzlicher Verwendung eines „control tags“.

15

Abbildung 3 zeigt das MALDI-TOF Massenspektrum des mit RNase T1 verdauten Transkriptes des künstlich methylierten APC-Genes (Bsp.1). Die Nummerierung der Peaks entspricht der aus Tabelle 2.

5

Abbildung 4 zeigt das MALDI-TOF Massenspektrum Beispiels 2.

10

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis des Beispiels 3. Es wurden CpG-Methylierungen in 10 Klonen (A-J) aus zwei bisulfit-umgewandelten Colon-Tumor-DNA-Proben (T1, T2) und zwei normalen Colon DNA Proben (N1, N2) analysiert. Gezeigt sind die Ergebnisse nach RNA-Spaltung und MALDI-TOF (links) bzw. Sequenzierung (rechts). Die schwarzen Kreise kennzeichnen die methylierten CpG-Positionen, die weissen Kreise kennzeichnen die unmethylierten CpG-Positionen, die grauen Kreise kennzeichnen Fragmente, die nicht klar zuzuordnen waren, und die Kreuze kennzeichnen CpG-Positionen, die der Analyse nicht zugänglich waren.

15

20

Abbildung 6 zeigt das Ergebnis des Beispiels 4. Es erfolgte eine direkte Analyse zweier bisulfit-umgewandelter Colon-Tumor-DNA-Proben (T1, T2) und zweier normaler Colon-DNA-Proben (N1, N2) über eine PCR, eine *in vitro*-Transkription, eine RNase-T1-Spaltung und eine anschließende MALDI-TOF-Analyse. Als Vergleich die DNA-Mischungen eines Standards (oben: Massenspektrum der Proben T1, T2, N1 und N2; unten: Spektrum der DNA-Gemische mit unterschiedlichen, definierten Methylierungsgraden).

25

30

Abbildung 7 zeigt das Agarosegel des Beispiels 3. Dargestellt ist die Amplifikation von bisulfitierter DNA von methylierter und unmethylierter DNA mittels methylierungsspezifischen T7-Domänen-Primern. Die Primer sind so gewählt, dass sie auf genomischer DNA und auf bisulfitierter DNA von unmethylierter DNA kein Produkt bilden. SssI Methylase behandelte bisulfitierte DNA jedoch kann amplifiziert werden

Abbildung 8 zeigt das MALDI-TOF Spektrum des Beispiels 3.

Nachfolgend ist die Tabelle 1 wiedergegeben:

DNA-NASBA Stand der Technik			Erfinderisches Verfahren: DNA-NASBA zum sensitiven Nachweis von DNA-Methylierung	
#	Schritt Bezeichnung	Komponente	Funktion	Komponente
1	Vorbereitung der Templat-DNA	<p>- zu analysierende Probe</p> <p>- kommerziell erhältliches DNA-Extraktions Kit oder respektive einzelne Komponenten für ein eigenständig erstelltes Protokoll („homebrew“)</p> <p>Die DNA wird entsprechend den Herstellerangaben bzw. der jeweiligen Protokolle aus den zu analysierenden Proben extrahiert.</p>	Die Extraktion der DNA sorgt dafür dass diese in angemessener Reinheit vorliegt und der nachfolgenden enzymatischen Reaktionen zugänglich wird.	Wie beschrieben im DNA-NASBA Stand der Technik
2				<p>- extrahierte DNA</p> <p>- Reagenzien zur Bisulfit-Konvertierung der DNA (typischerweise Na-Salze des Sulfits und Disulfits, Radikalfänger, organische Lösemittel, Wasser)</p> <p>- Gegenstand zur Hitzeinkubation des Reaktionsgefäßes</p> <p><b>Angemessene Mengen der oben beschriebenen</b> Komponenten werden in geeigneten Reaktionsgefäßen gemischt und für eine kurze Zeit bei hohen Temperaturen (typischerweise bei 95°C) inkubiert (typischerweise für 5 min) and anschließend für eine bestimmte Zeit (typischerweise 5-7 h) bei mittleren Temperaturen (typischerweise bei 50-65°C) inkubiert. Nachfolgend wird zur Desulfonierung NaOH oder Tris mit einem hohen pH Wert (typischerweise 9.5) dazugegeben und das Gemisch für eine kurze Dauer (etwa 20 min) bei hohen Temperaturen (typischerweise bei 95°C) inkubiert. Anschließend wird die Reaktionsmischung entsalzen.</p> <p>Methylierungsunterschiede an Cytosinen (im menschlichen Genom typischerweise im Sequenzkontext von CpG) werden durch Bisulfit-Konvertierung in Basen-Unterschiede übersezt: <b>methylierte Cytosine sind</b> nicht betroffen, Cytosine ohne Methylgruppe werden deaminiert, was zur Bildung von Uracil führt, welches in der PCR durch Thymin ersetzt wird.</p> <p>CpG-Positionen bleiben dabei unverändert CpG-Dinukleotide, wenn die Cytosine methyliert sind aber werden zu TpG Positionen an CpG-Positionen, die zuvor unmethyliert sind.</p>

DNA-NASBA Stand der Technik		Erfinderisches Verfahren: DNA-NASBA zum sensitiven Nachweis von DNA-Methylierung
Denaturieren von Templat-DNA und Anlagerung von Oligonukleotiden	<p>- Extrahierte DNA aus #1</p> <p>- DNA-Oligonukleotide (T7-tailed primer), die in ihrem 5'-Bereich aus einer Basensequenz bestehen, die der Promotersequenz der T7 DNA abhängigen RNA-Polymerase (T7DdRp) entspricht, und in ihrem 3'-Bereich aus einer Sequenz bestehen, die revers-komplementär zum sense-Strang der Zielsequenz innerhalb der Templat DNA (typischerweise 15 bis 30 bp) ist.</p> <p>- DNA Oligonukleotide (2<sup>nd</sup> primer), die eine Basensequenz enthalten, die revers-komplementär zu einer Zielsequenz (typischerweise 15 bis 30 bp) des antisense Strangs innerhalb der Templat-DNA ist und 50 bis 500 bp unterhalb (downstream) der Zielsequenz des T7-tailed Oligonukleotids liegt.</p> <p>- falls der Nachweis mittels einer spezifischen Sonde erfolgt: Sonden-Oligonukleotide (typischerweise Molecular Beacon, oder LightCycler Sonden) welche Sequenzen enthalten (typischerweise 15 bis 30 bp), die revers-komplementär zu einem sense-Bereich der Target-DNA sind, der durch die Primer (je einen der oben beschriebenen) begrenzt ist.</p> <p>- NASBA-Reaktions-Puffer (typischerweise enthaltend Tris, MgCl<sub>2</sub>, KCl, Dithiothreitol, DMSO, jedes dNTP, jedes NTP)</p> <p>- Gerät zur Hitzeinkubation der Reaktionsgefäße</p> <p>Angemessene Mengen der oben beschriebenen Komponenten werden in geeigneten Reaktionsgefäßen gemischt und für eine kurze Zeit (typischerweise 2 min) bei hohen Temperaturen (typischerweise 95°C) und nachfolgend für eine kurze Zeit (typischerweise 2 min) bei mittleren Temperaturen (typischerweise 41°C) inkubiert.</p>	<p>Wie beschrieben im DNA-NASBA Stand der Technik.</p>
	<p>Aufheizen des Gemisches aller erforderlichen Nukleinsäure-Komponenten sollte sicher stellen, dass die DNA-Doppelhelix und alle Sekundär-Strukturen aufgebrochen werden, welches eine wichtige Voraussetzung für das spezifische Binden der Primer an deren revers-komplementäre Sequenzen in der Templat-DNA im Anlagerungsschritt bei 41°C ist.</p> <p>Abhängig von der DNA Zusammensetzung ist das Denaturieren durch Erhitzen ein optionaler Schritt, der nicht unbedingt notwendig ist.</p>	<p>- Bisulfit-konvertierte DNA aus #2</p> <p>- DNA-Oligonukleotide (T7-tailed primer), die in ihrem 5'-Bereich aus einer Basensequenz bestehen, die der Promotersequenz der T7 DNA abhängigen RNA-Polymerase (T7DdRp) entspricht, und in ihrem 3'-Bereich aus einer Sequenz bestehen, die revers-komplementär zum (+)-Strang der Zielsequenz innerhalb der Templat-DNA (typischerweise 15 bis 30 bp) ist. Letztere Sequenz (Zielsequenz im Templat) darf keine CpG- oder TpG-Position enthalten.</p> <p>- DNA Oligonukleotide (2<sup>nd</sup> primer), die eine Basensequenz enthalten, die revers-komplementär zu einem Sequenzbereich (typischerweise 15 bis 30 bp) des (-)-Strangs der Zielsequenz innerhalb der Templat-DNA ist und 50 bis 500 bp unterhalb (downstream) der Zielsequenz des T7-tailed Oligonukleotids liegt. Auch hier darf diese Zielsequenz keine CpG- oder TpG-Position enthalten.</p> <p>- DNA-Nukleotide (Blocker), die eine Sequenz enthalten, die revers-komplementär zu einem Bereich im (-)-Strang der Zielsequenz sind welche TpG-Positionen aufweist und typischerweise 4-30 bp lang ist. Weiterhin sind diese Blocker durch eine Modifikation ihres 3'-Endes vor Verlängerung geschützt. Bevorzugterweise handelt es sich hierbei um Phosphorylierung. Diese Sequenz kann mit der Sequenz des 2ten Primers überlappen.</p> <p>- falls der Nachweis mittels einer spezifischen Sonde erfolgt: Sonden-Oligonukleotide (typischerweise Molecular Beacon, oder LightCycler Sonden) welche Sequenzen enthalten (typischerweise 15 bis 30 bp), die revers-komplementär zu einem (+)-Bereich der Target-DNA sind, der durch die Primer (je einen der oben beschriebenen) begrenzt ist und 1-4 CpG-Dinukleotide aufweist.</p> <p>- NASBA-Reaktions-Puffer</p> <p>- Gerät zur Hitzeinkubation der Reaktionsgefäße</p> <p>Appropriate amounts of components described above are mixed in a suitable reaction vessel and incubated for a short time (typically 2 min) at high temperatures (typically 95°C) and subsequently for a short time (typically 2 min) at medium temperatures (typically 41°C)</p>

3



		<b>DNA-NASBA Stand der Technik</b>		<b>Erfinderisches Verfahren: DNA-NASBA zum sensitiven Nachweis von DNA-Methylierung</b>	
	Verlängerung der T7-tailed primer durch RT	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reaktionsgemisch aus #3</li> <li>- Reverse Transkriptase (RT) (typischerweise aus „avian myeloblastosis virus“)</li> <li>- Gerät zur Inkubation von Reaktionsgefäßen bei angemessener Temperatur (typischerweise 41°C)</li> <li>- Angemessene Mengen von RT werden zur Reaktionsmischung zugegeben und das Reaktionsgefäß inkubiert.</li> </ul>	<p>Der T7-tailed Primer wird durch die RT verlängert, und dadurch wird eine (-)-DNA Kopie des sense Strangs erstellt.</p> <p>Falls in # 3 keine Denaturierung durchgeführt werden musste, können auch jetzt bereits die Enzyme wie in # 6 beschrieben hinzugegeben werden. #5 wird dementsprechend dann weggelassen.</p>	Wie beschrieben im DNA-NASBA Stand der Technik.	Wie beschrieben im DNA-NASBA Stand der Technik.
4					
	Denaturieren des Reaktionsproduktes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reaktionsgemisch aus #4</li> <li>- Erhitzen des Gemisches auf eine hohe Temperatur (typischerweise 95°C), für eine kurze Zeit (typischerweise 2 min).</li> </ul>	<p>Erhitzen stellt sicher dass die neu erstellten (-)-DNA-Kopien des Templates denaturiert werden, was eine Bedingung für das nachfolgende Anlagern des 2ten Primer in #6 ist.</p> <p>Dieser Schritt kann weggelassen werden, abhängig von der spezifischen Zielsequenz; für den Fall dass die Sequenzzusammensetzung des 2ten Primers ohne vorherige Deanturierung erlaubt, können die Enzyme die in # 6 beschrieben werden bereits in # 3 hinzugefügt werden.</p>	Wie beschrieben im DNA-NASBA Stand der Technik.	Wie beschrieben im DNA-NASBA Stand der Technik.
5					

<b>DNA-NASBA Stand der Technik</b>		<b>Erfinderisches Verfahren: DNA-NASBA zum sensitiven Nachweis von DNA-Methylierung</b>	
Anlagerung und Verlängerung des zweiten Primers	- denaturiertes Reaktionsgemisch aus #5 - T7 DdRp, RNaseH Angemessene Mengen der oben genannten Enzyme werden zu der Reaktionsmischung hinzugegeben und für eine längere Zeit (typischerweise 90 min) bei mittleren Temperaturen (typischerweise 41°C) inkubiert.	Der zweite Primer lagert sich an den kopierten (-)-DNA-Strang an und wird von der RT verlängert, wobei ein Doppelstrang generiert wird.	Wie beschrieben im DNA-NASBA Stand der Technik.
			Wie beschrieben im DNA-NASBA Stand der Technik. Wenn die Zielsequenz des Blockers mit der des 2ten Primers überlappt, wird die Verlängerung der (-)-DNA-Kopien, welche den unmethylierten Zustand repräsentieren behindert. Andernfalls werden die DNA-Templates aufgrund der Zusammensetzung des 2ten Primers, der keine CpG oder TpG-Positionen abdeckt unabhängig von ihrem Methylierungszustand berücksichtigt.
Transkription des Amplifikats durch die T7-RNA-polymerase	Geschieht in der Reaktionsmischung und während der Inkubation in Schritt # 6.	T7-RNA-polymerase bindet an die doppelsträngige T7-Promoter Sequenz und generiert multiple RNA-Kopien des (-)-Stranges.	Wie beschrieben im DNA-NASBA Stand der Technik.
			Der Blocker lagert sich an die neu erstellten (-)-RNA-Kopien an, welche TpG-Positionen in ihrer komplementären Region aufweisen, aber nicht an solche, welche CpG-Positionen aufweisen. Hierdurch wird eine RNA-DNA-Heteroduplex auf RNA-Kopien generiert, die den unmethylierten Zustand repräsentieren. Die RNA innerhalb dieser Heteroduplexe wird durch RNaseH verdaut. RNA-Kopien, welche den methylierten Zustand repräsentieren sind nicht betroffen.

P1437PC00-Tabelle1.doc

		<b>DNA-NASBA Stand der Technik</b>		<b>DNA-NASBA zum sensitiven Nachweis von DNA-Methylierung</b>
	Anlagerung der 2ten Primer an (-)-RNA-Kopie und Verlängerung dessen	Geschieht in der Reaktionsmischung und während der Inkubation in Schritt # 6.	Der zweite Primer lagert sich an die (-)-RNA-Kopie aus #7 an und wird durch die RT verlängert. Hierdurch wird ein RNA-DNA-Heteroduplex generiert.	Analog wie beschrieben im DNA-NASBA Stand der Technik. Siehe Schritt #6
9				
	Degradierung des RNA-Stranges durch RNaseH-Aktivität	Geschieht in der Reaktionsmischung und während der Inkubation in Schritt # 6.	Der (-)-RNA-Strang in der RNA-DNA-Heteroduplexe wird durch RNaseH verdaut.	Analog wie beschrieben im DNA-NASBA Stand der Technik.
10				
	Anlagerung des T7-tailed Primer an die (+)-DNA-Kopie und Verlängerung dessen	Geschieht in der Reaktionsmischung und während der Inkubation in Schritt # 6.	Der T7-tailed Primer lagert sich an die (+)-DNA-Kopie aus #10 an und wird durch die RT verlängert, wodurch eine doppelsträngige DNA generiert wird.	Analog wie beschrieben im DNA-NASBA Stand der Technik.
11				
	Eintritt in die zyklische Phase: Schritt #6	Geschieht in der Reaktionsmischung und während der Inkubation in Schritt # 6.	Siehe Schritt #7.	Analog wie beschrieben im DNA-NASBA Stand der Technik. Der Amplifikationsprozeß resultiert zum großen Teil in der Generation von RNA-Kopien, welche den methylierten Zustand repräsentieren.
12				
	Detektion der (-)-RNA-Kopien mittels einer spezifischen Sonde	Geschieht in der Reaktionsmischung und während der Inkubation in Schritt # 6.  Gerät zur Fluoreszenz-Detektion des Reporterfarbstoffs.	Die Sonde lagert sich an (-)-RNA-Kopien aus #7 und #12 an. Ein Fluoreszenz-Signal wird generiert. Kontinuierliche Bestimmung der RNA-Kopien Zahl durch <b>Messung der generierten</b> Fluoreszenz-Intensität.	Die Sonde lagert sich an (-)-RNA-Kopien an, welche den methylierten Zustand repräsentieren. Ein Fluoreszenz-Signal wird generiert. Kontinuierliche Bestimmung der RNA-Kopien Zahl durch Messung der generierten Fluoreszenz-Intensitäten.
13				

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen, dadurch gekennzeichnet, dass

5 a) die zu untersuchende DNA so umgesetzt wird, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten  
10 von Cytosin unterscheidet,

b) in die DNA eine Promotorsequenz eingeführt wird,  
c) RNA transkribiert wird,  
d) die RNA analysiert wird,  
e) auf den Methylierungsstatus der DNA geschlossen  
15 wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) die Promotorsequenz an die DNA liegt  
20 wird.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-2, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) eine PCR durchgeführt wird, bei dem einer der Primer eine Promotorsequenz trägt.  
25

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-2, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) ein NASBA- oder ein anderes auf Transkription basierendes Amplifikationsverfahren eingesetzt wird.  
30

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass als Promotoren T3-, T7- oder SP6-Promotoren verwendet werden.

- 5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse der RNA in Schritt d) mittels einer Hybridisierung an einen Oligomerarray erfolgt.
- 10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse der RNA in Schritt d) massenspektrometrisch erfolgt
- 15 8. Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen in DNA, dadurch gekennzeichnet, dass folgende Schritte durchgeführt werden:
- 20 a) die zu untersuchende DNA wird so umgesetzt, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,
- 25 b) die umgewandelte DNA wird mittels eines auf Transkription basierenden Amplifikationsverfahrens amplifiziert,
- 30 c) die Amplifikate werden analysiert
- d) es wird auf den Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen
9. Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen in DNA, dadurch gekennzeichnet, dass folgende Schritte durchgeführt werden:
- a) die zu untersuchende DNA wird so umgesetzt, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base

umgewandelt, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,

b) die umgewandelte DNA wird mittels eines auf Transkription basierenden Amplifikationsverfahrens amplifiziert, wobei die Amplifikation in Gegenwart mindestens eines methylierungsspezifischen Blockermoleküls stattfindet, das spezifisch an die Hintergrund-Nukleinsäure bindet, und deren Amplifikation behindert,

c) die Amplifikate werden analysiert,

d) es wird auf den Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Blockermoleküle mit der Hintergrund-RNA DNA-RNA-Hybride bilden, deren RNA-Teil im Laufe des Amplifikationszyklusses abgebaut wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Blocker um ein Oligonukleotid handelt, das mindestens ein methylierungsspezifisches Dinukleotid trägt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8-11, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate mittels Real-Time-Sonden nachgewiesen werden.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass die RNA vor der Analyse in Schritt d) chemisch oder enzymatisch fragmentiert wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Fragmentierung in Abhängigkeit von dem Methylierungsmuster der untersuchten DNA erfolgt.
- 5 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Fragmentierung über das Enzym RNase T1 erfolgt.
- 10 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 14-15, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse der Fragmente über MALDI-TOF, über elektrophoretische oder über chromatographische Verfahren erfolgt.
- 15 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14-16, dadurch gekennzeichnet, dass neben dem Promotor zusätzlich Kontrollsequenzen in die DNA eingeführt werden, an Hand derer die Vollständigkeit der Fragmentierung überprüft werden kann.
- 20 18. Verwendung der Verfahren nach den Ansprüchen 1-17 zur Diagnose oder Prognose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Cytosin-Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten, zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, zur Festlegung einer spezifischen Arzneimitteltherapie, zur Überwachung des Erfolges einer Arzneimitteltherapie, zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben und zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
- 25 19. Ein Kit, der aus einer Bisulfitreagenz und aus mindestens einem Primern, der eine Promotorsequenz trägt, besteht.
- 30

20. Ein Kit gemäß Anspruch 19, der zusätzlich Enzyme und/oder weitere Komponenten zur Durchführung eines auf Transkription basierenden Amplifikationsverfahren enthält.

5

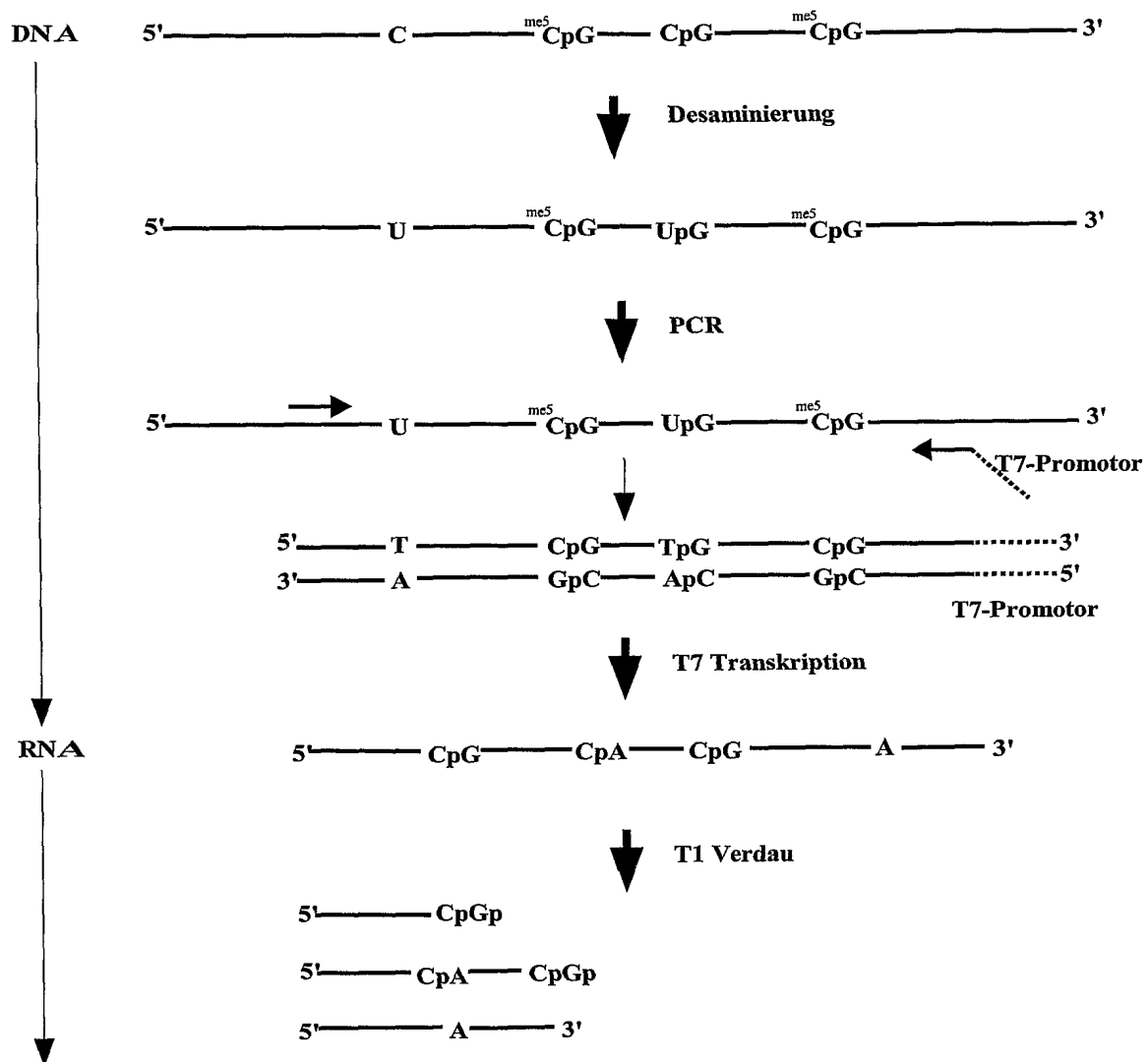
21 Ein Kit gemäß Anspruch 20, der zusätzlich mindestens ein methylierungsspezifisches Blockeroligomer enthält.

10 22. Ein Kit, der aus einer Bisulfitreagenz, Primern und einem Enzym, das RNA nukleotidspezifisch schneidet, besteht und optional eine Polymerase und weiteren für eine Amplifikation erforderlichen Reagenzien enthält.

15



1/8



2/8

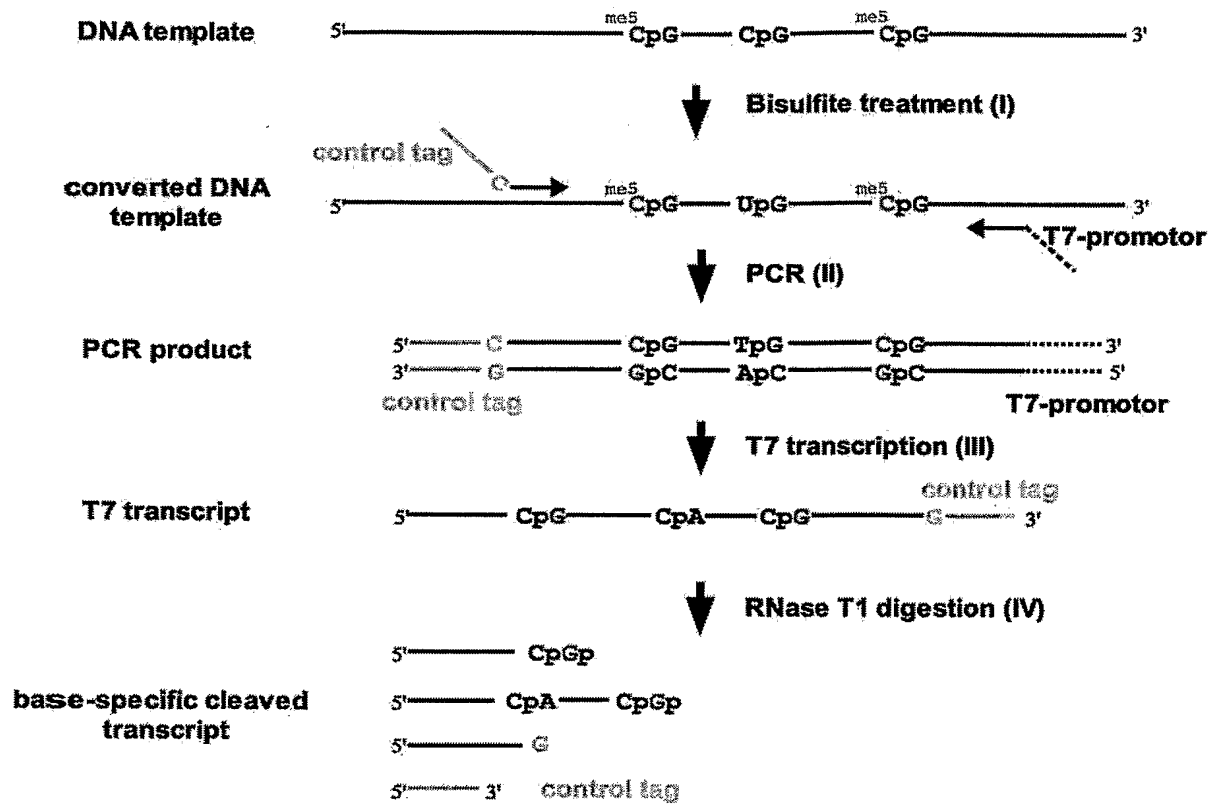


Abb . 2

3/8

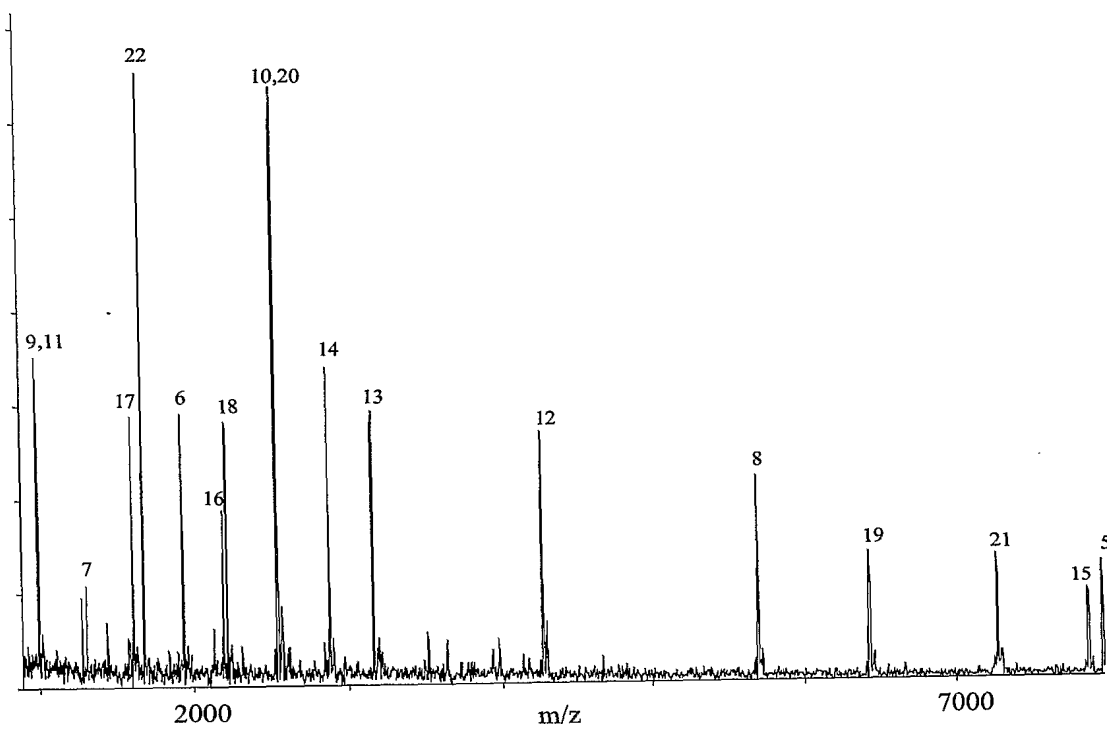


Abb. 3

4 / 8

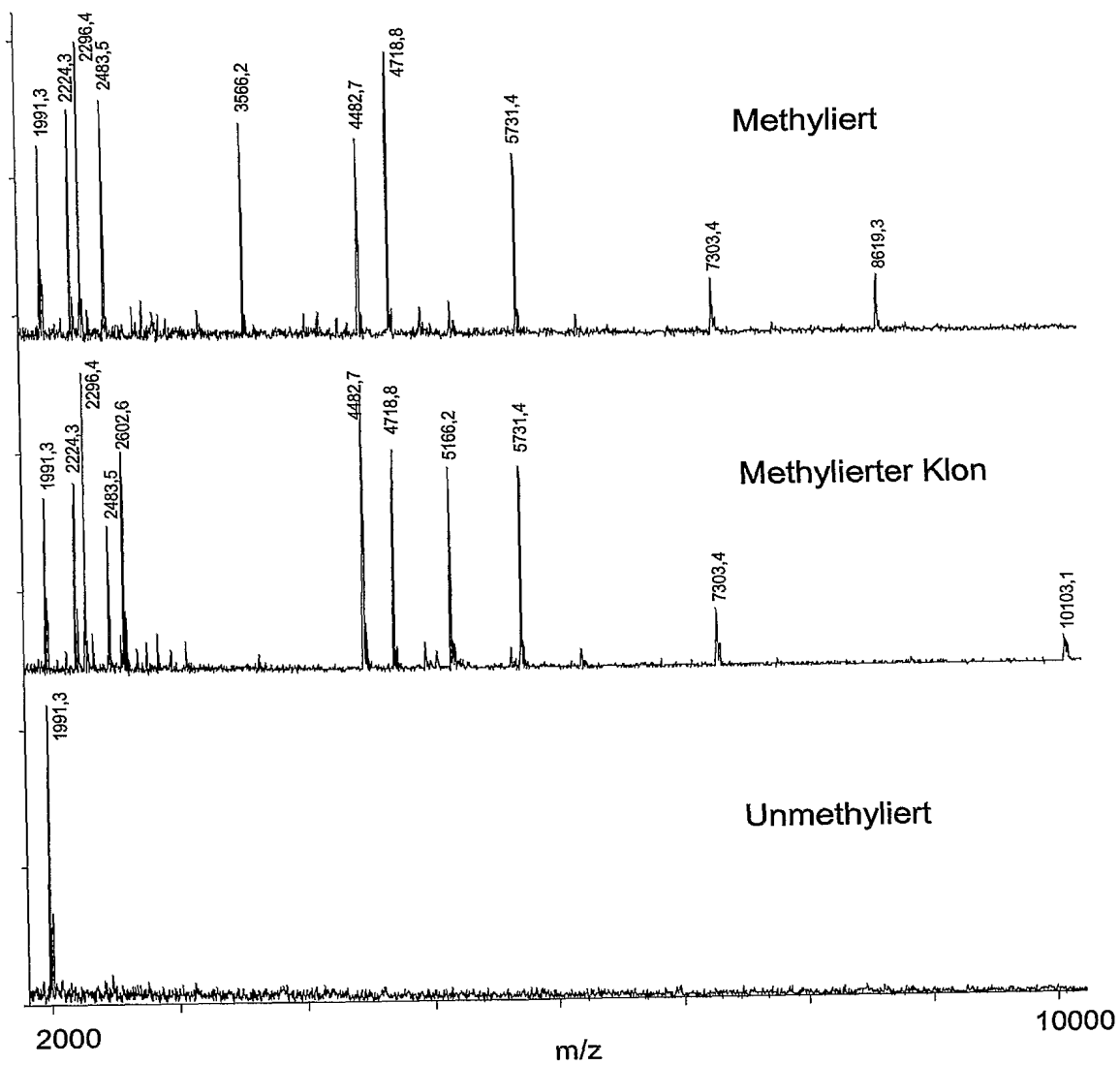


Abb. 4

Abb. 5

6/8

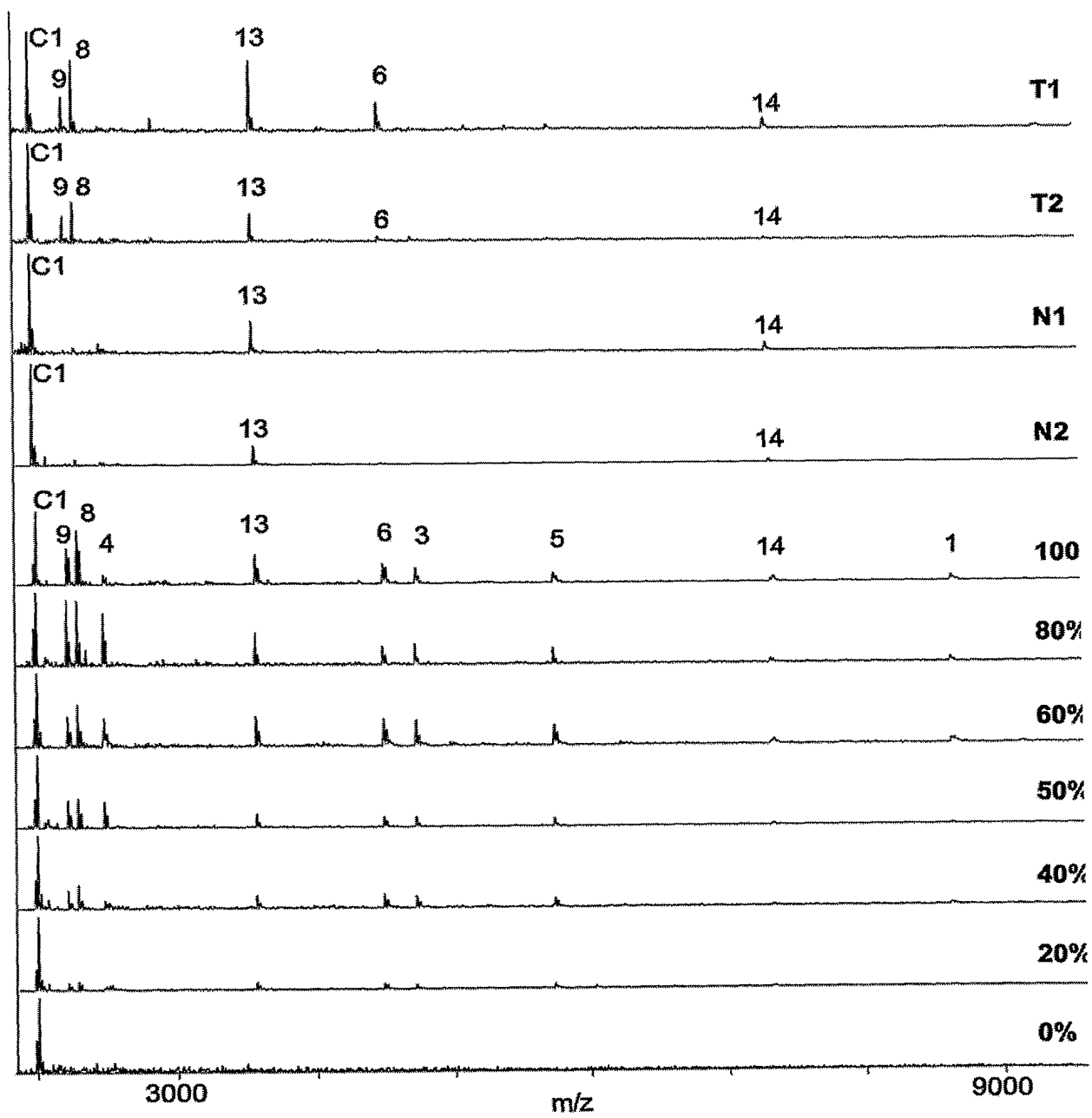


Abb. 6

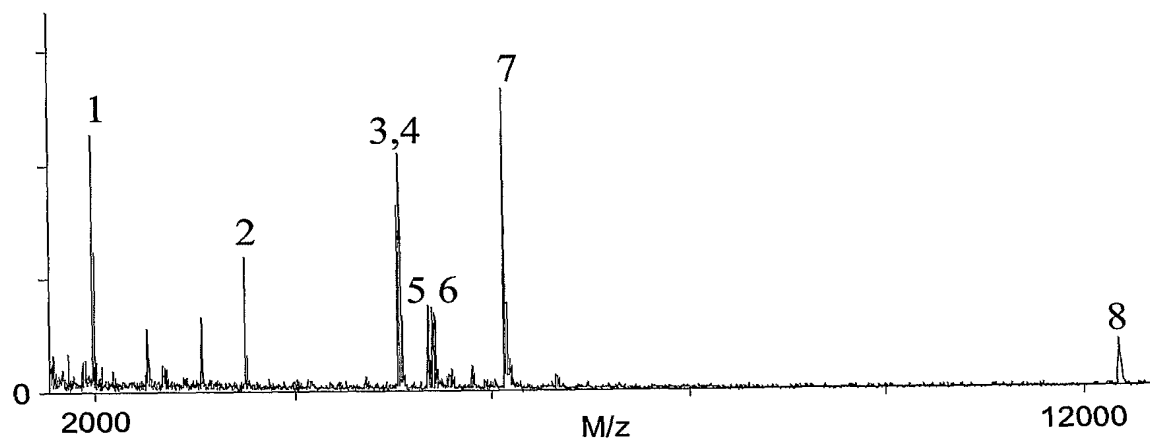
7/8

M H<sub>2</sub>O gen. +CH<sub>3</sub> -CH<sub>3</sub>



Abb . 7

8/8



5 Abb. 8



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/003366

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/070735 A (AKZO NOBEL N.V.; DEIMAN, BIRGIT, ALBERTA, LOUISA, MARIA; FRANTZEN, INGE) 12 September 2002 (2002-09-12) the whole document	1-22
Y	WO 98/02449 A (ONCOR, INC) 22 January 1998 (1998-01-22) page 52 - page 53; figure 9 page 67 - page 69	1-22
Y	WO 97/47762 A (SARNOFF CORPORATION) 18 December 1997 (1997-12-18) the whole document	1-22
Y	US 2003/082600 A1 (OLEK ALEXANDER ET AL) 1 May 2003 (2003-05-01) the whole document	9-12, 18-22
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 August 2005

Date of mailing of the international search report

06/09/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fotaki, M

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/003366

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>COTTRELL S E ET AL: "A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 32, no. 1, 13 January 2004 (2004-01-13), page e10, XP002321756 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document</p>	9-12, 18-22
P, Y	<p>-----</p> <p>WO 2004/113567 A (EPIGENOMICS AG; TETZNER, REIMO; DISTLER, JUERGEN) 29 December 2004 (2004-12-29) the whole document</p>	9-12, 18-22
Y	<p>-----</p> <p>WO 03/080863 A (EPIGENOMICS AG; BERLIN, KURT) 2 October 2003 (2003-10-02) the whole document</p> <p>-----</p>	7, 16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/003366

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02070735	A	12-09-2002	BR 0207914 A CA 2439795 A1 CN 1582339 A WO 02070735 A2 EP 1366179 A2 JP 2004528028 T US 2004152090 A1	16-08-2005 12-09-2002 16-02-2005 12-09-2002 03-12-2003 16-09-2004 05-08-2004
WO 9802449	A	22-01-1998	US 5866336 A US 6117635 A AU 3728597 A CA 2260973 A1 EP 0912597 A1 JP 3597869 B2 JP 2001513623 T JP 2003111599 A WO 9802449 A1 US 6090552 A	02-02-1999 12-09-2000 09-02-1998 22-01-1998 06-05-1999 08-12-2004 04-09-2001 15-04-2003 22-01-1998 18-07-2000
WO 9747762	A	18-12-1997	US 5914229 A AU 3376997 A WO 9747762 A1	22-06-1999 07-01-1998 18-12-1997
US 2003082600	A1	01-05-2003	DE 10112515 A1 DE 10158283 A1 CA 2435917 A1 CN 1539023 A WO 02072880 A2 EP 1370691 A2 JP 2004527241 T	14-11-2002 28-05-2003 19-09-2002 20-10-2004 19-09-2002 17-12-2003 09-09-2004
WO 2004113567	A	29-12-2004	WO 2004113567 A2	29-12-2004
WO 03080863	A	02-10-2003	DE 10214232 A1 DE 10253068 A1 AU 2003226710 A1 AU 2003227544 A1 WO 03080862 A1 WO 03080863 A1 EP 1488003 A1 EP 1488008 A1 JP 2005520556 T US 2005153296 A1 US 2005164193 A1	23-10-2003 27-05-2004 08-10-2003 08-10-2003 02-10-2003 02-10-2003 22-12-2004 22-12-2004 14-07-2005 14-07-2005 28-07-2005

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2005/003366

## A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 02/070735 A (AKZO NOBEL N.V.; DEIMAN, BIRGIT, ALBERTA, LOUISA, MARIA; FRANTZEN, INGE) 12. September 2002 (2002-09-12) das ganze Dokument	1-22
Y	WO 98/02449 A (ONCOR, INC) 22. Januar 1998 (1998-01-22) Seite 52 - Seite 53; Abbildung 9 Seite 67 - Seite 69	1-22
Y	WO 97/47762 A (SARNOFF CORPORATION) 18. Dezember 1997 (1997-12-18) das ganze Dokument	1-22
Y	US 2003/082600 A1 (OLEK ALEXANDER ET AL) 1. Mai 2003 (2003-05-01) das ganze Dokument	9-12, 18-22
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. August 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/09/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fotaki, M

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2005/003366

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	COTTRELL S E ET AL: "A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 32, Nr. 1, 13. Januar 2004 (2004-01-13), Seite e10, XP002321756 ISSN: 0305-1048 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	9-12, 18-22
P,Y	WO 2004/113567 A (EPIGENOMICS AG; TETZNER, REIMO; DISTLER, JUERGEN) 29. Dezember 2004 (2004-12-29) das ganze Dokument	9-12, 18-22
Y	WO 03/080863 A (EPIGENOMICS AG; BERLIN, KURT) 2. Oktober 2003 (2003-10-02) das ganze Dokument	7,16

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/003366

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 02070735	A	12-09-2002	BR 0207914 A	16-08-2005
			CA 2439795 A1	12-09-2002
			CN 1582339 A	16-02-2005
			WO 02070735 A2	12-09-2002
			EP 1366179 A2	03-12-2003
			JP 2004528028 T	16-09-2004
			US 2004152090 A1	05-08-2004
WO 9802449	A	22-01-1998	US 5866336 A	02-02-1999
			US 6117635 A	12-09-2000
			AU 3728597 A	09-02-1998
			CA 2260973 A1	22-01-1998
			EP 0912597 A1	06-05-1999
			JP 3597869 B2	08-12-2004
			JP 2001513623 T	04-09-2001
			JP 2003111599 A	15-04-2003
			WO 9802449 A1	22-01-1998
			US 6090552 A	18-07-2000
WO 9747762	A	18-12-1997	US 5914229 A	22-06-1999
			AU 3376997 A	07-01-1998
			WO 9747762 A1	18-12-1997
US 2003082600	A1	01-05-2003	DE 10112515 A1	14-11-2002
			DE 10158283 A1	28-05-2003
			CA 2435917 A1	19-09-2002
			CN 1539023 A	20-10-2004
			WO 02072880 A2	19-09-2002
			EP 1370691 A2	17-12-2003
			JP 2004527241 T	09-09-2004
WO 2004113567	A	29-12-2004	WO 2004113567 A2	29-12-2004
WO 03080863	A	02-10-2003	DE 10214232 A1	23-10-2003
			DE 10253068 A1	27-05-2004
			AU 2003226710 A1	08-10-2003
			AU 2003227544 A1	08-10-2003
			WO 03080862 A1	02-10-2003
			WO 03080863 A1	02-10-2003
			EP 1488003 A1	22-12-2004
			EP 1488008 A1	22-12-2004
			JP 2005520556 T	14-07-2005
			US 2005153296 A1	14-07-2005
			US 2005164193 A1	28-07-2005